

SÉRIE A. - N° 1062

N° D'ORDRE
1085

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE TITRE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS
(MENTION SCIENCES)

PAR

Monique PELLETIER

1^{re} THÈSE. — *ÉTUDE COMPARATIVE DE L'ACTION D'UN POLY-
PEPTIDE DU THYMUS SUR LES PROPRIÉTÉS
PHYSIOLOGIQUES DE QUELQUES BACTÉRIES.*

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 16 avril 1964, devant la Commission d'examen

Pr. A. MONNIER..... *Président.*

Pr. A. THOMAS..... }
Pr. M. JULIA } *Examineurs.*

D^r A. DELAUNAY.... : *(Invité).*

IMPRIMERIE GARNIER

- SAINT-MAIXENT-L'ÉCOLE -

SÉRIE A. - N° 1062

N° D'ORDRE
1085

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE TITRE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS
(MENTION SCIENCES)

PAR

Monique PELLETIER

1^{re} THÈSE. — *ÉTUDE COMPARATIVE DE L'ACTION D'UN POLY-
PEPTIDE DU THYMUS SUR LES PROPRIÉTÉS
PHYSIOLOGIQUES DE QUELQUES BACTÉRIES.*

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 16 avril 1964, devant la Commission d'examen

Pr. A. MONNIER.....	<i>Président.</i>
Pr. A. THOMAS.....	} <i>Examineurs.</i>
Pr. M. JULIA	
Dr A. DELAUNAY....	: <i>(Invité).</i>

IMPRIMERIE GARNIER
- SAINT-MAIXENT-L'ÉCOLE -



FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

Doyen..... M. ZAMANSKY

PROFESSEURS

G. JULIA	T Analyse supérieure et algèbre supérieure.	SCHWARTZ	T Calcul différent. et Intégral.
PRENANT	T Anatomie et Histologie comparées.	CHOUARD	T Physiologie végétale.
GRASSÉ	T Evolution des êtres organisés.	MALAVARD	T Aviation (Techn. Aéron.).
PRÉVOST	T Chimie organique.	BRELOT	T Calcul différent. et Intégral.
WYART	T Minéralo et Cristallog.	NORMANT	T Synthèse organique.
TEISSIER	T Zoologie.	BÉNARD	T Chimie minérale.
MANGENOT	T Biologie végétale (Orsay).	BUVAT	T Botanique (E.N.S.).
AUGER	T Physique quantique et relativité.	DUGUÉ	T Statistiques mathématiques.
MONNIER	T Physiologie générale.	SOULAIRAC	T Psychophysiologie.
PIVETEAU	T Paléontologie.	ULRICH	T Physiologie végétale appliq.
ROCARD	T Physique (E.N.S.).	MARÉCHAL	T Optique théor. et appliq.
CARTAN	T Mathématiques (E.N.S.).	KIRRMANN	T Théories chimiques.
LAFFITTE	T Chimie générale.	CHADEFAUD	T Botanique.
FAVARD	T Géométrie supérieure.	M ^{lle} LE BRETON	T Physiologie de la Nutrition.
COULOMB	T Physique du globe.	LELONG	T Application de l'analyse à la géométrie.
M ^{lle} COUSIN	T Biologie animale (S.P.C.N.).	DEVILLERS	T Anatomie et Histologie comparées.
CHRÉTIEN	T Chimie minérale.	EHRESMANN	T Topologie algébrique.
CRACH	T Zoologie.	FRANCON	T Physique (S.P.C.N.).
KASTLER	T Physique (E.N.S.).	GLANGEAUD	T Géographie phys. et Géolog.
EPHRUSSI	T Génétique.	GODEMENT	T Mathématiques (M.G.P.).
RIVIÈRE	T Géologie (S.P.C.N.) et Sédimentologie (Orsay).	PISOT	T Tech. math. de la Physique.
GAUTHERET	T Biologie végétale (P.C.B.).	ROCH	T Géologie.
LUCASHR.	T Recherches physiques.	SCHATZMANN	T Astrophysique.
THOMASHA.	T Biologie cellulaire.	TERMIER	T Géologie générale.
ARNULF	T Optique appliquée.	ZAMANSKY	T Mathématiques générales.
MORAND	T Physique Enseignement.	LENNUIER	T Physique (M.G.P.).
SOLEILLET	T Physique (P.C.B.).	RIZET	T Génétique (Orsay).
FORTIER	T Mécanique ex. des Fluides.	ROUTHIER	T Géologie appliquée.
PETIT	T Biologie maritime.	M ^{me} TONNELAT	T Physique théorique.
QUENEY	T Météorologie et dynamique atmosphérique.	DIXMIER	T Mathématiques (M.P.C.).
GALLIEN	T Embryologie.	SOUCHAY	T Chimie générale.
EICHORN	T Botanique.	AIGRAIN	T Electrotechnique générale.
DE CUGNAC	T Biologie végétale (S.P.C.N.).	BRUSSET	T Chimie systématique.
M ^{lle} CAUCHOIS	T Chimie-Physique.	M. LÉVY	T Physique théorique des hautes énergies (Orsay).
THELLIER	T Physique du globe.	M ^{me} CHAIX	T Chimie biologique.
L'HÉRITIER	T Biologie générale (Orsay).	M ^{me} HUREL-PY	T Biologie végétale (P.C.B.).
GRIVET	T Radioélectricité (Orsay).	PIAUX	T Chimie (M.P.C.).
PONCIN	T Mécanique générale.	BRUN	T Mécanique théor. des fluides.
DUBREIL	T Arithmétique et Théorie des nombres.	LEDERER	T Chimie biologique (Orsay).
QUELET	T Chimie organique.	M ^{me} DUBREIL	T Mathématiques (Agrég.).
CAGNIARD	T Géophysique appliquée.	M ^{me} LELONG	T Mathématiques II (E.N.S.).
CHAMPETIER	T Chimie macromoléculaire.	BELLAIR	T Géologie (S.P.C.N.).
CUVILLIER	T Micropaléontologie.	COTTE	T Physique, Electricité.
JUNG	T Géologie.	DUBOISJ.-E.	T Chimie organique.
TRILLAT	T Microscopie et diffraction électro.	LAMOTTE	T Zoologie (E.N.S.).
WIEMANN	T Chimie organique et struct.	MICHEL A.	T Chimie minérale (Orsay).
JACQUINOT	T Spectroscopie et Physique céleste (Orsay).	OLMER	T Energétique générale.
VASSY	T Physique de l'Atmosphère.	ROUAULT	T Mécanique appliquée.
DESTOUCHES	T Théorie physique.	GAUTHIER	T Chimie-Physique.
AMIEL	T Chimie générale.	BARCHIEWITZ	T Physique atomique.
HOCART	T Minéralo et Cristallog.	BROSSEL	T Physiologie comparée.
J.-P. MATHIEU	T Physique optique.	BUSER	T Physiologie végétale (Orsay).
COUTEAUX	T Cytologie.	CAMUS	T Physique II Thermo (Orsay).
MAY	T Zoologie (Orsay).	CASTAING	T Minéralo et cristallog.
CHOQUET	T Théorie des fonctions et Topologie.	CURIEN	T Physiologie végétale (Orsay).
FELDMANN	T Biologie végétale marine.	MOYSE	T Evolution des Êtres organis.
GUINIER	T Physique des Solides (Orsay).	NOIROT	T Chimie générale.
JOST	T Physiologie comparée.	POSSOMPES	T Zoologie.
FORTET	T Calcul des Probabilités et Physique mathématique.	PULLMANN	T Chimie quantique.
		TEILLAC	T Physique nucléaire et Radioactivité (Orsay).
		TONNELAT	T Biologie physico-chim. (Ors.).
		VILLE	T Econométrie.
		WILLEMART	T Chimie (P.C.B.).
		DODE	T Chimie (P.C.B.).
		FREYMAN	T Recherches physiques.

GUINOCHET.....	T	Biolog. vég. S.P.C.N. (Orsay)	DELLOUE.....		Physique de l'exosphère.
ROLLET.....	T	Chimie minérale.	GORENFLOT.....		Botanique II (Orsay).
Mlle JOSIEN.....	T	Chimie (S.P.C.N.).	HOUILLOIN.....		Biologie animale (P.C.B.).
CHEVALLEY.....	T	Géométrie algèbr. et théorie des groupes.	JULLIEN J.		Chimie S.P.C.N. (Orsay).
ARNOULT.....	T	Electronique (Orsay).	MALGRANGE.....	T	Technique mathématique et la Physique (Orsay).
CHAPELLE.....	T	Physique I (Orsay).	OLIVIER.....		Anthropologie.
DELANGE.....	T	Mathématiques I (Orsay).	NOZERAN.....	T	Botanique II (Orsay).
DENY.....	T	Mathématique génér. (Orsay)	BLANC-LAPIERRE.....	T	Physique E.N.S. (Orsay).
GERMAIN.....	T	Mécanique théor. des fluides.	CHEVAUGEON.....	T	Botanique (Orsay).
FLACHEG.....	T	Géologie.	KAHANE.....	T	Mathématiques (Orsay).
ALLARD.....	T	Chimie-Physique.	SAMUEL.....	T	Mathématiques (E.N.S.) fé- nines.
BERTHELOT.....	T	Physiqs. des particules fonda- mentales (Orsay).	KOURGANOFF.....	T	Astronomie (Orsay).
BRICARD.....	T	Météorologie et Physique de l'atmosphère.	THIERY.....	T	Mécanique céleste.
Mme ALBE-FESSARD..	T	Psycho-physiologie.	ABÈLES.....	T	Physique (S.P.C.N.).
FRIEDEL.....	T	Physique des solides (Orsay).	AMAT.....	T	Physique (P.C.B.).
M. JULIA.....	T	Etudes des Moléculaires com- plexes.	AUBOIN.....	T	Géologie.
LENDER.....	T	Biol. animale S.P.C.N. (Ors.)	Mme BENOIT-GUEUTAL.	T	Physique nucléaire et Radio- activité (Orsay).
MAGAT.....	T	Physico-Chimie des radio-élé- ments.	BOUGIS.....		Biologie marine (Villefran- che-sur-Mer).
Mlle QUINTIN.....	T	Electrochimie.	BRUHAT.....	T	Mathématiques (M.P.C.).
MONOD.....	T	Chimie du métabolisme.	BRUNN.....	T	Géologie historique (Orsay)
BENOIT.....	T	Physiol. animale (Orsay).	CHABBAL.....	T	Physique M.G.P. (Orsay).
DE POSSEL.....	T	Analyse numérique.	DEHEUVELS.....	T	Mathématique propédeutique
CHARLOT.....	T	Chimie analytique.	D'ESPAGNAT.....	T	Physique théorique (Orsay)
LEMÉE.....	T	Ecologie végétale (Orsay).	FURON.....	T	Géologie (S.P.C.N.).
GUÉRIN.....	T	Chimie M.P.C. (Orsay).	Mme GANS.....	T	Génétique.
CHATELET M.....	T	Chimie (P.C.B.).	GENÈVES.....		Biologie végétale (P.C.B.).
JEAN.....	T	Physique nucléaire (Orsay).	GUILBERT.....		Physique (C.U.S. Orléans).
MATTLER.....	T	Physique (S.P.C.N.).	HUPE.....	T	Pétrographie.
BERGERARD.....	T	Zoologie (Orsay).	HOLLANDE.....	T	Biologie générale.
BERTIN.....	T	Electronique (Orsay).	LIONS.....	T	Analyse numérique.
BOUSSIÈRES.....	T	Radiochimie.	MAITTE.....	T	Chimie (P.C.B.).
Mme COUTURE.....	T	Termo et Mécán. physique.	MEYER.....		Physique propédeutique.
ELLENBERGER.....	T	Géologie des grandes régions du globe.	NICOLAS.....		Géologie appliquée.
FRANC.....	T	Biologie animale (P.C.B.).	PANIGEL.....		Biologie générale.
SCHNELL.....		Botanique tropicale.	RAVIER.....		Pétrographie.
STOLKOWSKI.....	T	Physiologie végétale.	ROSEAU.....	T	Mécanique théor. des fluides
ACHER.....	T	Chimie biologique.	ROUBINE.....	T	Electronique.
BAUDOIN.....		Biologie animale (P.C.B.).	SILBER.....	T	Chimie (P.C.B.).
BEAUMONT.....		Biologie animale (S.P.C.N.).	UEBERSFELD.....	T	Electronique.
BLAMONT.....	T	Géophysique-ionosphère.	YVON.....	T	Théories physiques.
BOURREAU.....	T	Botanique.	HERVÉ.....	T	Mathématiques.
CURIE D.....		Physique (M.G.P.).	NÉRON.....	T	Mathématiq. M.P.C. (Orsay)
DURAND-DELGA.....	T	Géologie.	Mme PECKER-WIMEL..	T	Astrophysique.
FRÉON.....	T	Chimie organique (Orsay).	BALKANSKY.....		Physique (M.P.C.).
HELLER.....	T	Physiologie végétale.	LE CORRE.....	T	Electricité.
TORTRAT.....	T	Calcul des Probabilités.	DELCROIX.....	T	Physique théorique (Orsay)
CAILLEUX.....	T	Géologie (S.P.C.N.).	GOURDIN.....		Physique théor. des Hautes Energies (Orsay).
MAGNAN.....	T	Physique (S.P.C.N.).	LEHMANN.....	T	Physique expér. des Hautes Energies (Orsay).
DAUDEL.....	T	Mécanique ondulatoire appli- quée à la Chimie théor. et à la Physique nucléaire.	NATAF.....	T	Physique nucléaire et Radio- activité (Orsay).
Mlle FOURCROY.....		Biologie végétale (S.P.C.N.).	ECHALIER.....		Biologie animale (P.C.B.).
Mme CHOQUET-BRUHAT	T	Mécanique analytique et Mé- canique céleste.	BARRAUD.....		Physiologie cellulaire.
Mlle VEIL.....	T	Physiologie générale.	LIROET.....		Physiologie végétale (Orsay)
LWOFF.....	T	Microbiologie.	DARS.....		Géologie structurale et Géo- logie appliquée.
SIESTRUNK.....	T	Mécán. physique et expérim.	CAMEFORT.....	T	Botanique (Agrégation).
LACOMBE.....	T	Métallurgie des métaux nu- cléaires (Orsay).	VICHNIEWSKY.....	T	Mécanique industrielle.
BROCHARD.....	T	Physique P.C.B. (Orsay).	BLAQUIÈRE.....		Electronique (Orsay).
CABANNES.....	T	Mécanique générale.	ARNOUS.....	T	Physique théorique.
LESIEUR.....	T	Mathématiques I (Orsay).	TATIBOUET.....		Chimie (C.S.U. Orléans).
MAZET.....	T	Mécanique générale (Orsay).	MALLIAVIN.....	T	Mathématique propédeutique (Orsay).
CAIRE.....		Géographie phys. et Géolog. dynamique.	GAUDEMAR.....		Chimie propédeutique.
COMOLET.....	T	Mécanique des Fluides.	PEREZ Y JORBA.....		Physique expér. des Hautes Energies (Orsay).
CORABOEUF.....	T	Physiologie animale (Orsay).	DAVID.....	T	Chimie (Agrégation Orsay)
			BROUSSE.....	T	Mécanique théorique.

Secrétaire général..... R. POULLAIN

A MES PARENTS

*dont la tendresse et le dévouement ne
m'ont jamais fait défaut.*

A MON MARI

*qui m'a si affectueusement aidée et
encouragée.*

A MA FILLE

*avec l'espoir qu'elle comprenne les
vertus de la persévérance.*

Avec toute mon affection.

A MONSIEUR LE DOCTEUR A. DELAUNAY

Chef du Service de Pathologie Expérimentale de l'Institut Pasteur,
annexe de Garches.

A MADemoiselle S. BAZIN

Docteur en Pharmacie, Docteur ès Sciences,
Maître de Recherches au C.N.R.S.

Avec ma profonde gratitude.

INTRODUCTION

Chacun sait que l'organisme dispose de différents *mécanismes* pour neutraliser, et même détruire, les germes, pathogènes ou non, qui se sont introduits dans son intimité. L'un d'eux, le *mécanisme cellulaire* (ou phagocytose), a été découvert par E. METCHNIKOFF en 1884. Un autre, le *mécanisme humoral*, a été élucidé entre 1885 et 1900 ; nul n'ignore que celui-ci repose sur l'action antitoxique, opsonisante ou neutralisante, de globulines spéciales, appelées *anticorps*.

L'existence d'un troisième mécanisme était aussi suspectée depuis longtemps qui, lui, aurait fait intervenir, pour neutraliser ou détruire les germes, des *substances chimiques diverses*. Substances au demeurant bien distinctes des anticorps puisque, d'une part, elles sont des constituants d'un organisme normal et que, de l'autre, leur action n'a jamais l'étroite spécificité qui est dévolue aux anticorps.

Une de ces substances, trouvée par A. FLEMING en 1922, et nommée lysozyme, avait, au début, vivement intéressé les spécialistes. Puis, l'attention s'était détournée d'elle parce que cet enzyme — car le lysozyme est un enzyme — ne semblait pouvoir atteindre que des bactéries non pathogènes. Comme aucune autre découverte importante n'était faite dans les années suivantes, le mécanisme immunitaire par intervention de substances chimiques différentes des anticorps se voyait, peu à peu, oublié.

Cependant, cette disparition de l'actualité ne devait pas être éternelle. En 1941, se voyaient démontrées les vertus thérapeutiques de la pénicilline. L'ère des antibiotiques s'ouvrait. De nombreux principes actifs étaient isolés de moisissures, de champignons, de bactéries, de végétaux et même d'invertébrés (fourmis). Fallait-il admettre que de tels principes faisaient, en revanche, défaut dans les organismes plus élevés, en particulier chez les Mammifères ? La chose semblant peu probable, quelques auteurs se mettaient en devoir de les rechercher. Pour cela, les uns se décidaient à reprendre l'étude du lysozyme ou de produits plus anciennement connus encore mais qui, jusqu'alors, avaient peu intéressé (comme les *inhibines*). D'autres partaient à la recherche de substances encore inconnues.

Ces efforts, cette quête, devaient finir par être couronnés de succès.

En 1963, l'inventaire est déjà long qui indique de quelles substances bactéricides ou bactériostatiques peut normalement, pour assurer sa défense, disposer l'organisme. Ces substances sont d'ailleurs fort variables par le lieu où elles se trouvent, leur nature chimique, leur mode d'action.

C'est ainsi que certaines se trouvent dans le sang (le meilleur exemple à fournir ici est la properdine), d'autres existent dans des liquides organiques divers (exemple : le *lysozyme*, les *inhibines*, la *lacténine*...), d'autres enfin peuvent être extraites de cellules ou de tissus [exemple : *phagocytine* de J. C. HIRSCH (58), *leukine* de R. C. SKARNES et D. W. WATSON (98)].

Cependant, les unes sont des *globulines*, les autres des *polypeptides basiques*, des *protamines*, des *histones*. D'autres encore peuvent être identifiées comme faisant partie du groupe de la *spermine* et de la *spermidine*, etc...

Modes d'action enfin. Ceux déjà connus apparaissent très divers. Il n'y a, en effet, aucune comparaison possible entre l'effet particulier exercé sur l'acide muramique des parois bactériennes par le lysozyme, l'action de la properdine qui, elle, n'intervient qu'après concours du complément et des ions magnésium, l'action plus complexe encore de la spermine...

Nous ne pouvons ici même développer plus longuement cette question.

Ce que nous voulions dire surtout c'est que le troisième mécanisme général de l'Immunité, à savoir celui qui repose sur l'effet antibactérien d'« *antibiotiques internes* » (*) mérite d'être retenu, considéré, étudié, au même titre que les autres.

A l'instigation de notre Maître, le Docteur A. DELAUNAY, Chef de Service à l'Institut PASTEUR, nous avons été conduite, nous-même, à nous intéresser à l'action de quelques-uns de ces « *Antibiotiques internes* ». Certains, depuis 1957, devaient surtout retenir notre attention, à savoir des *complexes polypeptidiques* que l'on peut isoler, assez commodément, du thymus de veau.

Comment nous avons été amenée à nous intéresser à ces complexes, nous le dirons dans la *première partie de ce travail*. Alors, nous dirons aussi :

1. — Comment ces complexes — et, en particulier, l'un d'eux qui nous a semblé plus spécialement actif et que nous avons étiqueté P II — peuvent être extraits du thymus.

2. — Comment nous avons pu déterminer leurs effets antibactériens, *in vitro* et *in vivo*.

3. — A quels résultats positifs, enfin, nos expériences ont abouti.

Le moment étant venu d'entreprendre notre *Thèse de Doctorat*, nous avons pensé que le sujet de celle-ci pourrait être, à la fois, une prolongation et une extension de nos recherches précédentes :

(*) Nous ne sommes pas la première à employer ce terme ; déjà en 1957, H. FISCHER et K. ROWE au VI^e Congrès de la Société Européenne d'Hématologie, l'utilisaient dans leur article : *Basische polypeptide als « endogen antibiotika » ihr vorkommen und ihre wirkungsweise.*

- *Une extension* : En comparant aux effets antibactériens du polypeptide P II, les effets que peuvent ou pourraient déterminer, eux-mêmes, le chlorure de calcium, la trypsine et le lysozyme.
- *Une prolongation* : En précisant davantage encore, si possible, les effets antibactériens du polypeptide P II et, surtout, en recherchant si ces effets peuvent être augmentés, ou au contraire atténués, par une action simultanée ou préalable des trois substances que nous nommions il y a un instant.

Mais pourquoi avons-nous décidé de retenir celles-ci et non pas d'autres ? Nous le dirons avec précision, après avoir parlé du polypeptide P II, dans la *première partie de ce travail*.

L'ensemble des expériences que nous avons effectuées dans le domaine ainsi délimité a demandé, de notre part, trois années d'un travail assidu. Des méthodes diverses et variées ont été utilisées. Des expériences — les plus nombreuses — ont été pratiquées *in vitro*. D'autres *in vivo*.

Dans la *première partie de ce travail*, celle-là même où nous indiquons, après avoir rappelé nos recherches antérieures sur le polypeptide P II, les raisons du choix du chlorure de calcium, de la trypsine et du lysozyme, nous décrivons les *méthodes générales* qui nous ont servi d'un bout à l'autre de nos recherches. En revanche, il nous a paru légitime de décrire les méthodes particulières seulement où sont décrites les expériences faites avec elles.

Dans la *seconde partie*, nous avons réuni tous les faits nouveaux que nous ont permis d'obtenir les expériences *in vitro*. Finalement, pour la clarté de notre exposé, nous les avons répartis en sept chapitres :

Le premier concerne des *expériences de base* ;

Le second, les *modifications morphologiques* que les différentes substances étudiées ont provoquées au niveau des germes ;

Le troisième, les *modifications des caractères de culture* ;

Le quatrième, les *modifications du métabolisme respiratoire* ;

Le cinquième, les *modifications du pouvoir antigénique* ;

Le sixième, enfin, les *modifications de la sensibilité à la phagocytose* apportées aux germes par les divers traitements appliqués.

Nous avons consacré le septième chapitre à une *interprétation générale* des résultats obtenus *in vitro*.

Troisième partie : Ici, ont été rassemblées nos observations recueillies *in vivo*.

A la fin de chaque chapitre de la seconde partie, comme à la fin de la troisième partie, nous avons donné des résumés des principaux faits observés. Ils sont nombreux. Beaucoup sont entièrement originaux. Certains nous paraissent avoir une portée significative.

Dans le chapitre VII de la seconde partie et dans le dernier paragraphe de la troisième partie, nous avons repris nos différents résumés en les

faisant suivre de *considérations générales*. Celles-ci avaient pour but de montrer :

1. — D'une part, ce qu'apportent de nouveau, *eu égard à la physiologie microbienne*, nos recherches personnelles ;
2. — D'autre part, ce que les mêmes recherches ajoutent à notre connaissance du *mécanisme chimique de l'Immunité*, autrement dit, des « *antibiotiques internes* ».

*
**

Ce travail a été effectué dans le Service de Pathologie Expérimentale de l'Institut PASTEUR, annexe de GARCHES (Seine-et-Oise), sous la direction de Monsieur le Docteur A. DELAUNAY, Chef de Service. Nous sommes heureuse de pouvoir lui exprimer ici notre très profonde et très respectueuse gratitude. Son enthousiasme, sa foi dans la recherche, son goût du travail bien fait, ainsi que la clarté et la précision de ses remarques, ont été pour nous un sujet d'admiration et un exemple constant. Grâce à sa grande bonté et à son affectueuse sollicitude, nous avons pu travailler dans un agréable climat de confiance. Pour tout cela, nous voulons l'assurer de notre très vif et très sincère attachement.

Nous prions Monsieur le Professeur PASTEUR VALLERY-RADOT, notre « parrain » au Centre National de la Recherche Scientifique, de bien vouloir accepter tous nos remerciements pour sa grande bienveillance à notre égard.

Nous n'aurons garde d'oublier dans notre reconnaissance Monsieur le Professeur J. TREFOUEL, Directeur de l'Institut PASTEUR, qui a bien voulu nous accepter dans cet établissement et nous faire bénéficier de ses conseils éclairés, et aussi Monsieur L. NICOL, Directeur de l'annexe de l'Institut où se trouve le laboratoire du Docteur A. DELAUNAY.

Nous remercions, également, la Direction du Centre National de la Recherche Scientifique, et en particulier la Commission de Pathologie Expérimentale, qui veut bien nous compter, depuis 1956, parmi ses chercheurs.

Monsieur le Professeur A. MONNIER nous fait le grand honneur de présider cette thèse, qu'il veuille bien accepter l'hommage de notre respectueuse reconnaissance.

Nous tenons non moins à exprimer toute notre gratitude à Messieurs les Professeurs A. THOMAS et M. JULIA, rapporteur et examinateur de notre travail, ainsi qu'à Mademoiselle le Professeur C. VEIL, que nous remercions pour sa grande bienveillance.

C'est un plaisir pour nous de témoigner notre respectueux attachement à Mademoiselle S. BAZIN, Maître de Recherche au Centre National de la Recherche Scientifique. Organisatrice exemplaire, chercheur infatigable, nous l'avons toujours trouvée à nos côtés dans les moments difficiles. Avec une gentillesse et une obligeance jamais en défaut, elle nous a

fait bénéficier de ses connaissances étendues en Biochimie. Qu'elle veuille bien trouver, ici, l'expression de notre très affectueuse reconnaissance.

Il nous est particulièrement agréable d'associer à ces remerciements notre collègue et amie, Mademoiselle M. HENON, Docteur ès Sciences. Un contact quotidien depuis de longues années nous a permis d'apprécier son aide amicale et dévouée. Nous l'assurons de toute notre affection.

Que soient aussi remerciés tous ceux qui, à des titres divers, ont allégé notre tâche et, en particulier, les *Techniciens du Service de Pathologie Expérimentale* qui nous ont apporté, avec un dévouement inlassable, une aide très efficace.

PLAN DU TRAVAIL

Nous avons divisé notre travail en trois grandes parties.

PREMIÈRE PARTIE :

Nous l'avons consacrée à l'étude du matériel et des méthodes générales qui seront utilisés tout au long de notre thèse.... p. 19

DEUXIÈME PARTIE :

Elle comprend toutes nos expériences personnelles effectuées *in vitro*. Elle comporte sept chapitres :

CHAPITRE I : Expérience princeps	p. 45
CHAPITRE II : Modifications morphologiques	p. 72
CHAPITRE III : Modifications des caractères de culture.....	p. 88
CHAPITRE IV : Modifications du métabolisme respiratoire...	p. 105
CHAPITRE V : Modifications du pouvoir antigénique.....	p. 122
CHAPITRE VI : Modifications de la sensibilité à la phagocytose	p. 132
CHAPITRE VII : Interprétation générale des résultats obtenus <i>in vitro</i>	p. 147

TROISIÈME PARTIE :

Elle rend compte de nos expériences personnelles effectuées *in vivo* p. 169

CONCLUSIONS GÉNÉRALES	p. 195
BIBLIOGRAPHIE	p. 199

PREMIÈRE PARTIE

MATÉRIEL ET MÉTHODES

PREMIÈRE PARTIE

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Nous avons mis à profit ce chapitre, pour présenter le matériel d'étude et les méthodes générales qui seront utilisés tout au long de ce travail.

Nous décrirons successivement :

MATÉRIEL D'ÉTUDE :

- I. — *Les germes étudiés :*
 - leur nature,
 - leur provenance,
 - les raisons de notre choix.
- II. — *Les substances utilisées :*
 - leur nature,
 - leur provenance,
 - les raisons de notre choix.

MÉTHODES GÉNÉRALES :

- Le mode de traitement des germes par les substances :*
- Traitement simple.
 - Traitement double.

MATÉRIEL D'ÉTUDE

I. — Germes mis en expérience.

Les germes que nous avons retenus, pour nos expériences, ont été au nombre de trois :

- A) le staphylocoque TIN,
- B) une *Salmonella typhimurium*,
- C) un *Proteus morganii*.

Nous indiquerons, ici, leur provenance et quelques-unes de leurs principales caractéristiques. D'autres renseignements seront donnés dans le chapitre III de la seconde partie de ce travail, quand seront étudiés comparativement les caractères de culture de germes normaux ou de germes traités par les différentes substances utilisées.

A) — Le *staphylocoque* TIN : Il nous avait été obligeamment fourni par le Docteur VAISMAN (Institut FOURNIER, Paris) qui, lui-même, le tenait, depuis 1944, du Service des collections de l'Institut PASTEUR. C'est un staphylocoque blanc, immobile, de un μ environ de diamètre. Il liquéfie la gélatine et fermente la plupart des glucides. Sur le milieu de CHAPMAN, il donne une culture abondante qui fait virer le milieu. Il est indole, uréase, V. P. et R. M. négatif (V. P. = réaction de VOGES-PROSKAUER, R. M. = réaction au rouge de méthyle). Des explications concernant ces deux réactions seront fournies dans le chapitre III de la seconde partie. L'épreuve de la staphylocoagulase est, avec le staphylocoque TIN, positive en une demi-heure.

Ajoutons, enfin, que ce germe est pathogène pour les souris, dose 50 % mortelle ou dose L 50 = 25×10^7 germes.

B) — *Salmonella typhimurium* : Elle nous avait été confiée, en 1957, par le Docteur D. ROWLEY, alors que celui-ci se trouvait encore à l'Institut WRIGHT FLEMING de Londres. C'est un bacille mobile, possédant peu de cils. Il ne liquéfie pas la gélatine. Il fermente le glucose, le maltose, la mannite et l'amidon, mais non le saccharose ou le lactose. Il est indole, uréase et V. P. négatif, R. M. positif.

Son pouvoir pathogène pour les souris est assez élevé, dose 50 % mortelle ou dose L 50 = $6,25 \times 10^7$ germes.

C) — *Proteus morganii* : Ici, il est nécessaire que nous donnions davantage de précisions.

Ce germe fut accidentellement isolé par nous, à partir du sang de souris, dans des conditions très particulières.

Lors d'expériences faites pour augmenter ou diminuer, à volonté, la résistance anti-infectueuse non spécifique de souris normale, nous faisons un large usage d'un principe chimique, isolé du bacille typhique par la méthode classique de A. BOIVIN (12), à l'acide trichloracétique, et connu sous le nom de lipopolysaccharide.

Un jour, nous venait l'idée d'ensemencer le sang de souris qui avaient reçu, apparemment sans aucun dommage, une injection de ce lipopolysaccharide.

L'expérience s'était déroulée de la façon suivante :

A dix souris albinos, mâles et femelles, pesant de dix-huit à vingt grammes, alimentées par des biscuits spéciaux fournis par la Maison CAUSSE, et de l'eau, apparemment en excellent état, avait été injectée, par voie intra-péritonéale, une dose non toxique du lipopolysaccharide typhique, soit 0,1 mg sous un volume de 1 ml.

Vingt-quatre heures plus tard, *tous les animaux semblaient en excellent état*. Il étaient alors sacrifiés par inhalation prolongée d'éther. Le sang du cœur recueilli par ponction stérile était ensemencé sur un tube de bouillon nutritif ordinaire. Les dix tubes finalement obtenus étaient déposés dans une étuve à 37°.

Vingt-quatre heures plus tard, en retirant ces tubes de l'étuve, nous avions la surprise de constater que sept d'entre eux présentaient une culture pure (ou parfois mélangée à un staphylocoque) de *germes très petits, GRAM négatif*.

Devant ce résultat inattendu, nous décidions d'ensemencer le sang du cœur de dix souris témoins (provenant du même lot d'animaux, ayant même poids et recevant même nourriture) mais qui, elles, n'avaient été soumises à aucun traitement.

Des tubes mis en culture et examinés vingt-quatre heures plus tard, un seul présentait une culture positive, le germe trouvé étant un staphylocoque.

Alors, nous refaisions plusieurs fois la première expérience. Cent tubes étaient finalement examinés, après ensemencement avec le sang de cent souris qui, toutes, au préalable, avaient été traitées par le lipopolysaccharide.

Résultats : Quatre-vingts fois, une culture positive était obtenue et, chaque fois, était retrouvé le petit germe dont nous avons parlé.

L'expérience témoin, sur un total de cent souris non traitées, ne conduisait dans aucun cas à l'obtention du même germe. Dans sept cas seulement, pouvait être isolé un staphylocoque.

Que fallait-il en conclure ?

Devait-on parler d'une action spécifique du lipopolysaccharide injecté ?

Pour essayer de répondre à cette question qui, tout naturellement, se posait, de nouvelles séries d'expériences étaient entreprises.

Dans une première série, nous avons injecté, à la place du lipopolysaccharide, 10 mg de *cortisone*, par voie sous-cutanée, sous un volume de 1 ml. Vingt souris furent ainsi traitées.

Résultats : Après examen des vingt tubes ensemencés avec le sang des animaux, prélevé vingt-quatre heures après l'injection, poussait, dans deux tubes, un staphylocoque. Dans aucun cas, cependant, ne pouvait être isolé le germe GRAM négatif.

Dans une seconde série, nous avons injecté à trente souris, 1 mg d'un *complexe polypeptidique* appelé par nous P II, par voie intra-péritonéale, sous un volume de 1 ml (nous aurons l'occasion de donner, dans la seconde partie de ce chapitre, les caractéristiques de ce complexe, d'indiquer comment nous le préparons et les raisons pour lesquelles il était normal que nous l'utilisions).

Résultats : Des trente tubes finalement ensemencés, nous avons pu retirer, en culture pure ou parfois mélangé à un staphylocoque, à dix-huit reprises le germe GRAM négatif.

Enfin, dans une troisième série d'expériences, nous avons traité cent souris simplement par 1 ml d'eau physiologique, injectée par voie intrapéritonéale.

Résultats : Des cent tubesensemencés avec le sang des animaux, nous avons pu retirer, *quatre-vingt-onze fois*, le germe GRAM négatif, en culture pure ou mélangé à un staphylocoque.

La mise en route de recherches complémentaires devait nous apporter les nouveaux faits suivants :

Pour l'obtention du germe GRAM négatif que nous avons trouvé, il n'était pas nécessaire de recourir à une souche spéciale de souris. Nous avons utilisé des souris d'élevage de l'Institut PASTEUR ; souris SWISS ou DESVIGNES ou R. A. P. (Institut PASTEUR), souris N. C. S. (Docteur FAUVE, Institut PASTEUR, annexe de Garches).

Tous les résultats observés ont été identiques.

De même, il nous a été impossible de mettre en évidence une influence du sexe des animaux, de la température ambiante ($+ 4^{\circ}$ ou $+ 20^{\circ}$), ou encore du jeûne (avec eau) maintenu pendant quarante-huit heures.

Résultats encore semblables quand était utilisée une eau physiologique préparée à partir d'eau bi-distillée fraîche, ce qui permettait d'éliminer toute trace de pyrogènes.

Dans le sang des souris, le germe GRAM négatif apparaissait, en général, huit heures après l'injection. Il disparaissait du sang cinq à sept jours plus tard, les animaux restant pendant toute cette période en excellent état.

Nous n'avons jamais pu le retrouver chez des rats ou des cobayes.

Quelle explication convient-il de donner à cet ensemble de faits ?

Pour l'instant encore, elle nous fait défaut.

L'identification du germe GRAM négatif isolé par nous a été faite dans le Service de Mademoiselle LAMBIN, Professeur de Bactériologie de la Faculté de Pharmacie de Paris. Nous reproduisons, ici, le compte rendu que nous avons reçu :

1. — ASPECT DES CULTURES :

- a) — *Sur gélose* : Après vingt-quatre heures à 37° , culture abondante. Petites colonies rondes à bords irréguliers de un à deux mm. de diamètre, opaques, de couleur grisâtre. Aspect identique après quarante-huit heures.
- b) — *Sur bouillon* : Après vingt-quatre heures à 37° , trouble, ondes moirées, soyeuses. Pas de voile en surface ni de collerette. Après quarante-huit heures, identique, dépôt léger au fond du tube. Odeur putride.
- c) — *En eau peptonée* : Trouble, ondes moirées. Dépôt au fond du tube.
- d) — *Sur gélatine* : Cultive bien à 22° . Pas de liquéfaction, non protéolytique.

2. — COLORATION DE GRAM :

Petites bacilles, GRAM négatif, très polymorphes, souvent en diplocoques, parfois presque cocciformes, en amas ou en courtes chaînettes.

3. — CARACTÈRES BIOCHIMIQUES :

a) — Action sur les sucres :

- *Lactose* : + sur milieu de KLIGLER,
± sur eau peptonée au bleu de bromothymol.
- *Glucose* : + sur milieu de KLIGLER, avec abondant dégagement gazeux.
+ sur bouillon glucosé au bleu de bromothymol.
- *Saccharose* : — sur bouillon saccharosé au bleu de bromothymol.
- *Mannite* : + avec gaz en quarante-huit heures.
- *Amidon* : + avec gaz en vingt-quatre heures.

b) — Réactions diverses :

- *Uréase* : + en deux heures.
- *Indole* : + rapidement, en eau peptonée et réactif de KOVACS.
- SH_2 : — sur milieu de KLIGLER,
— sur gélose au sous-acétate de plomb.
- *Désaminase* : +
- *Acide phénylpyruvique* : +
- *Réaction au rouge de méthyle* : + sur milieu de CLARK et LUBS.
- *Réaction de VOGES-PROSKAUER* : — sur milieu de CLARK et LUBS.

4. — CARACTÈRES DE CULTURE SUR MILIEUX SPÉCIAUX :

- a) — *Milieu au citrate* : (milieu de KOSER-SIMMONS), culture nulle.
- b) — *Milieu à l'esculine* : culture + , fermentation nulle.
- c) — *Milieu au rouge neutre* : culture nulle en vingt-quatre heures, culture positive en quarante-huit heures, avec fluorescence et production de gaz.
- d) — *Milieu S. S.* : Milieu inchangé, colonies grises, à centre opaque.
- e) — *Gélose de KRISTENSEN* : milieu inchangé, colonies rosées.
- f) — *Gélose de DRIGALSKI* : milieu inchangé, colonies grisâtres.
- g) — *Milieu éosine-bleu de méthylène* : colonies rose vif, pas de reflets métalliques.
- h) — *Milieu au cyanure* : culture positive.

5. — MOBILITÉ : germe immobile.

CONCLUSIONS : *Proteus Morganii*.

Etant donné les circonstances qui nous avaient permis de l'isoler, nous pensions, naturellement, que ce *Proteus morganii* n'était pas pathogène pour les souris. Répétons encore une fois que les animaux chez lesquels nous avons pratiqué une injection soit de lipopolysaccharide, soit de P II, soit d'eau physiologique restaient, au moment du sacrifice (même fait tardivement), en excellent état.

Ce fut donc avec un grand étonnement qu'un jour nous avons l'occasion de constater que ce *Proteus morganii*, après culture sur gélose, mis en suspension dans de l'eau physiologique et injecté, par voie intrapéritonéale, à des souris normales (et tout à fait identiques à celles qui nous servaient dans les expériences précédentes), se montrait *très pathogène*. Son pouvoir pathogène était même très supérieur à celui du germe le plus dangereux que nous possédons au laboratoire, à savoir la souche *Salmonella typhimurium* ROWLEY.

Exemple :

Dose L 50 des *Salmonella typhimurium* $6,25 \times 10^7$ germes

Dose L 50 des *Proteus morganii*. $1,25 \times 10^7$ germes

A quoi peut-être dû ce fort pouvoir pathogène ?

Nous ne pouvons pas le dire encore avec précision. Un fait toutefois devait nous frapper au cours d'expériences qui seront décrites plus loin en détail : Notre *Proteus morganii* n'est pas phagocytable par les polynucléaires inflammatoires de cobayes.

Les raisons qui nous ont incitée à retenir les trois germes que nous venons de décrire tiennent d'abord au fait qu'ils poussent aisément sur les milieux usuels, qu'ils sont de conservation aisée, enfin qu'ils sont faciles à colorer par les méthodes classiques (GRAM, etc...).

Cependant, d'autres raisons ont aussi été prises en considération, qui tiennent, celles-ci, aux conditions dans lesquelles devaient être faites les expériences.

Pour les expériences *in vitro*, il était judicieux de choisir des germes de taille différente : deux germes de taille moyenne : le staphylocoque et la *Salmonella typhimurium* ; un germe de petite taille : le *Proteus morganii*. Nous avons voulu retenir aussi des germes de formes diverses. Un cossus : le staphylocoque ; deux bacilles : la *Salmonella typhimurium* et le *Proteus morganii*.

Nous voulions, d'autre part, disposer de germes qui ne se comportent pas de la même façon vis-à-vis des colorants, en particulier des colorants utilisés dans la méthode de GRAM. En pratique, nous avons disposé d'un germe GRAM positif : le staphylocoque, et de deux germes GRAM négatif : la *Salmonella typhimurium* et le *Proteus morganii*.

Enfin, nous avons tenu à utiliser des germes différents par leur sensibilité naturelle à la phagocytose. Les indications fournies par la méthode

standard (phagocytes de cobayes, expériences *in vitro*) dont nous disposons, ici, au laboratoire ont été les suivantes. Un germe était bien phagocytable : le staphylocoque (70 à 75 % de cellules avaient absorbé un ou plusieurs germes en une heure). Un germe n'était que moyennement phagocytable : la *Salmonella typhimurium* (50 % de cellules seulement avaient pu se montrer actives). Un germe enfin, se montrait rebelle à la phagocytose : le *Proteus morganii*.

Nous ajouterons en terminant que, pour les expériences *in vivo*, ces trois germes offraient l'avantage d'avoir un pouvoir pathogène élevé et constant.

Les animaux qui nous ont servi, pour ces expériences, ont été, dans tous les cas, des souris fournies par le Service spécialisé de l'Institut PASTEUR (Responsable : Monsieur LACASSAGNE). C'était des souris albinos, mâles (qui pesaient de dix-huit à vingt grammes). Au laboratoire, elles étaient nourries avec des biscuits spéciaux de la Maison CAUSSE, et de l'eau.

II. — Substances chimiques ou biologiques ayant servi au traitement des germes.

Outre la fraction polypeptidique, extraite par nous du thymus de veau et appelée P II (à laquelle nous consacrerons un paragraphe particulier), les substances que nous avons choisies sont au nombre de trois :

Un sel : le *chlorure de calcium* :

Deux enzymes : la *trypsine* et le *lysozyme*.

Nous donnerons, ici, quelques caractéristiques de ces corps, et les raisons qui ont guidé notre choix. Nous serons brève en ce qui concerne le chlorure de calcium et la trypsine, qui sont, en somme, des corps bien connus. En revanche, nous nous étendrons assez longuement sur le P II, point de départ de notre thèse, et sur le lysozyme, ce produit retenant de plus en plus l'attention des Bactériologistes.

A) — COMPLEXE POLYPEPTIDIQUE EXTRAIT DU THYMUS DE VEAU, P II :

1. — *Historique* : Au cours d'une longue suite de travaux, faits en collaboration avec notre Maître, le Docteur A. DELAUNAY, chef de Service à l'Institut PASTEUR, et notre collègue, Mademoiselle Michelle HENON, et poursuivis de 1957 à 1959 (27, 31, 35, 36, 38, 86), nous avons pu démontrer que de nombreux sérums d'animaux, notamment des sérums de cobayes, ont le pouvoir d'agglutiner fortement les noyaux isolés d'hématies de coq. Un peu plus tard, nous pouvions mettre en évidence une action nucléoagglutinante d'un type voisin, en utilisant, à la place des sérums, certains *extraits tissulaires*, en particulier des extraits de thymus de veau. Finalement, nous donnions tout notre intérêt à ces extraits.

Pourquoi ?

- Parce que le thymus correspond à un tissu « Propre ». L'extraction que nous devions faire ici n'était pas gênée par le sang, comme elle l'est souvent, quand l'organe traité est la rate ou le foie ;
- Plus encore, peut-être, parce que c'est un tissu riche en histones. Les histones sont des corps voisins des protamines. Or, au cours de nouvelles expériences, nous avons pu voir que des protamines ont, à elles seules, un fort pouvoir nucléoagglutinant.

2. — *Mode d'extraction* : Pour extraire, à partir du thymus, la fraction qui nous intéressait, nous avons d'abord utilisé la méthode de R.-J. DUBOS et J.-G. HIRSCH (40, 59). Plus tard, nous avons personnellement mis au point trois méthodes originales. Parmi les produits fournis par ces quatre méthodes, l'un nous a paru plus actif, celui que nous avons étiqueté *P II*. Nous décrirons ici, brièvement, ces diverses méthodes en nous étendant plus longuement sur le mode d'obtention du *P II*.

a) — *Méthode de R.-J. DUBOS et J.-G. HIRSCH* :

Digestion acide (C1H) du thymus, quatre jours à 18° (le pH ne doit pas dépasser 2,5). Après filtration, et repos de deux heures à 18° à pH 7, nouvelle filtration et précipitation du filtrat par de l'acide picrique, en solution aqueuse saturée. Mélange ajusté à pH 7 et gardé une nuit à + 4°. Après centrifugation, remise en suspension du précipité par de l'alcool chlorhydrique. Contact une nuit à + 4°. Filtration et addition d'acétone au filtrat. Formation d'un précipité qui est lavé par de l'acétone et séché à l'air.

Rendement : d'après R.-J. DUBOS et J.-G. HIRSCH, de 430 à 1.430 mg par Kg de thymus.

b) — *Méthode personnelle au C1 Na* :

Digestion acide (C1H) du thymus pendant quatre jours à 18° (le pH ne doit pas dépasser 2,5). Centrifugation. Précipitation du surnageant par du C1 Na à demi-saturation. Centrifugation. Culot dissous par de l'eau distillée. Nouvelle précipitation par C1 Na. Lavages par alcool et éther. Séchage à l'air.

Rendement : 10 g de poudre par Kg de thymus.

c) — *Méthode personnelle P* :

Digestion acide (C1H) du thymus quatre jours à 18° (le pH ne doit pas dépasser 2,5). Centrifugation. Le surnageant est amené à pH 9,5 par addition de soude 4 N. Gros précipité. Centrifugation. Culot repris par de l'eau distillée acidifiée à pH 4,5. Centrifugation. Addition au surnageant (pH 7) d'alcool à 96°. Contact une nuit à + 4°. Centrifugation, nouveau traite-

ment du surnageant (pH 7) par de l'alcool à 96°. Formation d'un précipité qui est lavé par de l'éther et desséché à l'air.

Rendement : 5 g de poudre par Kg de thymus.

d) — *Méthode personnelle à l'alcool (P II) :*

Des thymus de veau sont nettoyés, pesés, coupés en petits morceaux, enfin déposés dans quatre volumes d'acide citrique à 1 %. La préparation est agitée, à plusieurs reprises, dans un mixeur (temps total de l'opération : six minutes). Puis, centrifugation d'une durée de dix minutes à 3.500 tours par minute, dans une centrifugeuse refroidie. Le surnageant est rejeté. Le culot est remis en suspension dans trois volumes d'acide citrique à 0,2 %. Agitation et mélange soigneux. Puis, centrifugation (cinq minutes) à 3.000 tours par minute. Le surnageant, cette fois encore, est rejeté. Le culot est lavé à deux reprises par trois volumes d'acide citrique à 0,2 %, la vitesse de centrifugation allant chaque fois en diminuant (la dernière centrifugation ne devant pas excéder 1.500 tours par minute) et les liquides surnageants étant régulièrement éliminés. Le dernier culot est repris par trois volumes de ClH 0,25 N., temps de contact : dix minutes à 18°, puis centrifugation d'une durée de dix minutes à 4.000 tours par minute. Le culot est rejeté. Addition au surnageant (à pH 7) de trois volumes d'alcool à 96°. Le mélange est disposé une nuit à + 4°. Formation d'un précipité important. Centrifugation. Le culot est recueilli, lavé une fois par l'alcool et une fois par l'éther, enfin desséché à l'air.

Rendement : 7 g de poudre par Kg de thymus.

Toutes les expériences qui seront rapportées ici et qui mettaient en jeu un polypeptide, ont été faites avec la fraction isolée du thymus de veau par la méthode personnelle dite à l'alcool, **fraction appelée P II.**

3. — *Caractères chimiques du P II* : On peut les présenter sous la forme suivante :

Biuret	++ +
Hopkins	—
Millon	+
Sakaguchi	++ +
Bial	—
Fehling	—
Molisch	—
Ehrlich (hexosamines)	—

Le P II est aisément soluble dans l'eau. Une solution aqueuse de P II, mise en présence de NH_4OH (1/5), conduit à l'obtention d'un abondant précipité qui ne se redissout pas dans un excès d'ammoniaque.

Tenant compte de l'ensemble de nos résultats, nous avons admis que le P II était « *une substance polypeptidique sans copule glucidique* ». D'autre part, étant donné sa solubilité particulièrement grande en milieu acide, et son affinité pour les corps acides (héparine, acide chondroïtine sulfurique...), nous avons cru pouvoir préciser : **Polypeptide basique**.

4. — *Propriétés physiologiques in vitro* : Ayant constaté, comme nous l'avons déjà dit, que des noyaux d'hématies de coq, se trouvent agglutinés dans une solution de P II, nous avons admis que cette agglutination traduisait une union entre le polypeptide et les acides nucléiques présents dans les noyaux cellulaires.

Mais, les bactéries étant, comme les noyaux cellulaires, très riches en nucléoprotéines, il était logique que nous recherchions si le P II pouvait aussi agglutiner des germes variés.

Alors, nous pouvions constater les faits suivants :

P II en solution ajouté à des germes en suspension dans l'eau physiologique jouit d'un fort *pouvoir agglutinant* (54, 87). Ajouté à un milieu de culture ensémené, P II *modifie presque toujours le développement bactérien* (arrêt de la culture ou germes agglutinés au cours de leur multiplication) (55).

P II *diminue fortement* ou même *inhibe complètement le métabolisme respiratoire* de nombreux germes (32, 89).

Enfin, P II se montre *capable de renforcer la phagocytose* des germes par les polynucléaires (28, 29, 30, 37, 53, 88).

Donnons, sur tout cela, quelques détails.

- a) — *Agglutination* :

Nous avons étudié, au total, dix germes : les uns GRAM positif, deux staphylocoques, l'un pathogène (TIN), l'autre non, le *Micrococcus lysodeikticus*, une sarcine orange, un synocoque (wagon), un *Chromobacterium violaceum* ; les autres GRAM négatif, un bacille typhique (forme *smooth*), un colibacille très pathogène pour les souris (colibacille Star), le bacille de DANYSZ, une souche de *Salmonella typhimurium*. Tous ces germes, après culture de vingt-quatre heures sur gélose, étaient lavés à plusieurs reprises par de l'eau physiologique. Le dernier culot était amené, également par de l'eau physiologique, à une concentration convenable :

5×10^8 germes par ml.

A deux volumes de P II en solution plus ou moins concentrée était ajouté un volume de la suspension de germes. Le mélange était maintenu de deux à vingt-quatre heures à $+18^\circ$. A ce moment, lecture des résultats.

Résultats :

- Agglutination extrêmement nette pour la plupart des germes en présence d'une solution contenant 2 mg de P II par ml.
- L'agglutination constatée se formait rapidement. Elle était visible déjà après une heure, et complète après deux heures. Les bactéries, d'abord réunies en amas, tombaient au fond des tubes. Après agitation de ceux-ci, elles se remettaient en suspension, mais l'agglutination reprenait place dès que les tubes étaient de nouveau au repos.
- L'agglutination diminuait, en intensité, quand les doses utilisées de P II décroissaient. La dose limite d'action était comprise entre 0,1 et 0,2 mg par ml de produit.
- Des variations de pH comprises entre 6 et 8 ne modifiaient pas l'intensité de l'agglutination. En revanche celle-ci se voyait supprimée quand étaient ajoutés au milieu soit du chlorure de calcium, soit du chlorure de magnésium.
- Des solutions de P II soumises à une tyndallisation de une heure à 56°, pendant trois jours consécutifs gardaient intact leur pouvoir agglutinant. Il en était de même après dialyse de quarante-huit heures contre de l'eau physiologique.

b) — Influence exercée par P II sur la croissance, in vitro, des germes :

Les germes utilisés ont été les mêmes que pour l'étude de l'agglutination.

Les ensemencements avaient lieu dans trois types de milieux :

- *Milieu A* : Bouillon 50 (4 ml). Ce milieu était du bouillon ordinaire dilué au 1/50^e par de l'eau physiologique.
- *Milieu B* : Bouillon 50 (4 ml) + solution de P II (1 ml). La concentration finale de P II dans ce milieu était de 0,4 mg par ml.
- *Milieu C* : Bouillon 50 (4 ml) + eau physiologique (1 ml). Ce milieu constituait le témoin véritable du milieu B.

pH des milieux A, B et C, environ 7.

Les germes étaient entretenus par passage sur bouillon ordinaire, puis ensemencés en milieu A. Vingt-quatre heures plus tard, 0,2 ml de la culture étaient portés dans les tubes contenant le milieu B ou le milieu C, et les tubes en question étaient déposés quarante-huit heures dans une étuve à 37°. Lorsqu'une culture (agglutinée ou non) avait pris place, 0,2 ml étaient prélevés et ensemencés sur une nouvelle série de tubes contenant ou le milieu B ou le milieu C.

Résultats :

- Dans quelques cas, le P II a arrêté d'emblée le développement des germes mis en expérience. Parfois, une culture était observée dans le premier tube ensemencé, mais elle était peu abondante et les germes pouvaient être agglutinés. Transportée dans de nouveaux tubes, où se trouvait également P II, elle pouvait, soit donner une subculture, soit s'avérer stérile.
- Les résultats observés étaient plus nets quand on utilisait un milieu de culture dont le pouvoir nutritif était assez faible. C'est la raison pour laquelle nous nous sommes servi de préférence d'un bouillon dilué cinquante fois.
- Même en milieu pauvre, les résultats se sont montrés assez variables d'un germe à l'autre.

c) — *Influence exercée par P II sur le métabolisme respiratoire des germes :*

Les germes utilisés étaient les mêmes, cette fois encore. Le protocole expérimental a comporté deux techniques tout à fait différentes.

- *Première technique :* Des tubes contenant 4 ml de bouillon 50 étaient ensemencés avec 0,2 ml d'une culture de vingt-quatre heures en bouillon ordinaire non dilué, puis ils étaient déposés, également vingt-quatre heures, dans une étuve à 37°. Au sortir de l'étuve, 1 ml d'eau physiologique stérile ou 1 ml d'une solution de P II en eau physiologique (contenant 2 mg par ml ou des doses plus faibles) était ajouté à ces tubes. Les cultures abondantes étaient agitées et maintenues une heure à la température du laboratoire. 1 ml du contenu de chacun des tubes de culture était alors porté dans une fiole de WARBURG contenant 2 ml d'eau physiologique glucosée à 0,02 M.

L'expérience se poursuivait pendant cinq heures, selon la technique classique de WARBURG. Détermination de la quantité d'oxygène consommée par heure par 10^8 germes par ml.

- *Seconde technique :* Dans une fiole de WARBURG contenant 2 ml d'eau physiologique glucosée, était déposé 1 ml d'une suspension de germes provenant d'une culture de vingt-quatre heures en bouillon 50.

Dans la dérivation, étaient ajoutés 0,2 ml d'une solution en eau physiologique de P II à 2 mg par ml, ou 0,2 ml d'eau physiologique. Agitation des fioles montées sur les manomètres, robinets ouverts, pendant dix minutes, afin d'équilibrer les températures. A ce moment, les liquides

contenus dans les dérivations étaient délicatement versés dans les fioles.

L'expérience se poursuivait pendant cinq heures selon la technique classique de WARBURG. Détermination de la quantité d'oxygène consommée par heure, par 10^8 germes par ml.

Résultats :

Action inhibitrice considérable exercée par le P II sur le métabolisme respiratoire des germes.

Nous pouvions préciser également que cette action était immédiate.

Dose limite de cette action :

Pour une diminution de 35,5 %, concentration finale de P II dans le milieu..	0,004 mg
Pour une diminution de 90 à 95 %, concentration finale de P II dans le milieu	0,01 mg

d) — Influence exercée par le P II sur la sensibilité à la phagocytose, *in vitro*, des germes :

Nous avons utilisé, ici, des polynucléaires retirés d'un exsudat péritonéal de cobaye obtenu après injection locale de bouillon bactériologique stérile.

Les culots leucocytaires étaient repris, en tube :

- soit par 1 ml de RINGER ;
- soit par 1 ml de sérum frais de cobaye, dilué au demi ;
- soit par 1 ml de sérum chauffé de cobaye, dilué également au demi.

A ces suspensions homogènes, étaient ajoutées IV gouttes d'une suspension :

- soit de germes normaux ;
- soit de germes qui avaient été laissés, pendant deux heures, au contact d'une solution de P II (2 mg par ml) puis, qui, après centrifugation avaient été remis en suspension dans de l'eau physiologique.

Après agitation, les mélangés étaient gardés, une heure, dans une étuve à 37°. Le contenu des tubes une fois décanté, les cellules tapissant le fond étaient recueillies et étalées sur lames. Finalement, les frottis obtenus étaient colorés par le bleu de KÜHN.

Résultats :

Dans tous les cas, les germes traités par P II se sont montrés très bien phagocytés, même quand ils étaient maintenus dans du sérum décomplémenté par chauffage ou du liquide de RINGER (staphylocoque).

Cette phagocytose rappelait, par son intensité, celle que l'on obtient en présence des immunsérums les plus riches en anticorps. Il y avait, non seulement absorption rapide, mais encore digestion des germes dans les vacuoles cytoplasmiques.

5. — *Propriétés physiologiques de P II, in vivo* : Elles seront décrites et discutées dans la troisième partie de ce travail (étude du pouvoir pathogène des germes traités).

6. — *Discussion* : Ces divers résultats une fois acquis, il nous fallait répondre à un certain nombre de questions.

Etait-ce la première fois que se voyait démontrée une action antibactérienne de polypeptides ?

En ce qui concerne l'action opsonisante, nous pouvions le penser. En revanche, d'autres auteurs avaient déjà signalé que certains polypeptides basiques, extraits de tissus, différents mais peu éloignés cependant des nôtres, avaient le pouvoir de faire perdre leur pigment à des germes pigmentés, de lyser des germes saprophytes, enfin d'atténuer la virulence de quelques germes pathogènes [L.W. BLOOM et J.R. PRIGMORE (10), R.C. SKARNES et D.W. WATSON (97, 98), R.J. DUBOS et J.G. HIRSCH (40, 59) aux Etats-Unis, T. AMANO et coll. (3) au Japon].

Nous aurons à revenir sur tous ces points dans la troisième partie de ce travail.

Comment des polypeptides sont-ils capables d'exercer une action antibactérienne ?

Pour beaucoup d'auteurs, dans le passé, ce serait grâce à leur pouvoir de se combiner avec les acides nucléiques des bactéries.

Aujourd'hui, on pense plutôt qu'il s'agirait d'une combinaison entre les groupements cationiques du polypeptide, et les groupements anioniques de la surface bactérienne (groupements acides de l'acide muramique, et groupements PO_4H_3 des phosphatides). Mais ce mécanisme attend encore une démonstration précise.

Cette combinaison entraînant des perturbations d'ordre métabolique dans les cellules, celles-ci ou périraient ou ne pourraient plus vivre que dans un état précaire.

Du moins, personnellement, nous avons pu apporter un certain nombre de preuves en faveur de la fixation du P II sur la surface bactérienne.

- a) — Des germes, d'abord traités par le P II, puis mis en suspension dans de l'eau physiologique restent agglutinés ;

- b) — *Le Micrococcus lysodeikticus* traité, pendant cinq heures par P II, devient, même après lavage, insensible à l'action lytique du lysozyme ;
- c) — Les bacilles typhiques, d'abord traités par P II, deviennent incapables d'adsorber l'anticorps spécifique et le complément ;
- d) — Enfin, en employant de fortes concentrations de germes, nous avons pu « épuiser » une solution de polypeptide. Le surnageant n'avait plus de pouvoir agglutinant. Il ne précipitait plus en présence de sérum frais de cobaye, comme le fait normalement une solution de P II.

Tous les polypeptides basiques — et les corps apparentés — sont-ils doués d'une action antibactérienne ?

Nous pouvons, sur la foi de nombreuses expériences, répondre *négativement*.

- a) — Aucun de nos germes n'a été agglutiné par des solutions d'arginine (2 mg par ml), de lysine (2 mg par ml), d'histamine (2 mg par ml), ni de spermine (1 mg par ml). Tous ces corps étaient utilisés par nous, en solution physiologique de pH 7.
- b) — Nous avons observé [après R. WOLFF et J. BRIGNON (127)], une certaine agglutination dans des solutions de *sulfate de protamine* (1 mg par ml).
- c) — Précisons, enfin, qu'avec des polypeptides extraits par nous du thymus de veau par d'autres méthodes, nous n'avons observé, *in vitro*, ni agglutination ni phagocytose des bactéries.

B) — *LE CHLORURE DE CALCIUM* : $\text{Cl}_2 \text{Ca}$, R.P., en poudre, fourni par la Maison PROLABO. Il contenait deux molécules d'eau. Poids moléculaire de 147. Ce corps, en principe, peut exercer deux actions. A faibles concentrations (0,2 M), il peut, sous forme d'ions, *se combiner aux charges anioniques de la surface bactérienne* (par exemple anions phosphates) d'où possibilité, pour la bactérie atteinte, d'un changement de perméabilité. Cependant, à fortes concentrations (1 M), la molécule de ce sel peut exercer *une action dissociante sur les liaisons hydrogène*. Par rupture de ces liaisons, il arrive que les complexes protéines-lipides, de même que les complexes protéines polysaccharides, se trouvent dissociés. En conséquence, il se produit une modification de la surface bactérienne.

C) — *LA TRYPSINE* : Enzyme fourni, sous forme pulvérulente, par Mademoiselle G. AMOUREUX (Chef de Service à l'Institut PASTEUR, annexe de GARCHES). Son titre est de : environ 300 unités WILLSTATTER.

C'est une protéase capable de dégrader des protéines et des peptides de poids moléculaires divers; cela jusqu'au stade des

peptides de faible poids moléculaire et d'acides aminés libres. C'est aussi une *endopeptidase* capable de rompre certaines liaisons peptidiques au niveau des acides aminés basiques : arginine et lysine.

Si nous avons pensé à retenir cet enzyme, c'est d'abord pour son pH optimum d'action qui est voisin de la neutralité (pH 7 à 8). C'est aussi que son action paraît se porter *uniquement* sur les protéines de la surface bactérienne. La trypsine, grosse molécule, devait être incapable, du moins dans des conditions analogues à celles que nous comptons utiliser, de franchir la paroi bactérienne.

On sait que les deux propriétés de la trypsine que nous venons de nommer ont été mises à profit pour la préparation des cellules que l'on veut cultiver *in vitro* ; voilà qui suffirait à prouver que l'enzyme en question permet, du moins dans certaines conditions, le maintien d'une vie cellulaire.

D) — *LE LYSOZYME* :

1. — *Historique* : Le lysozyme est un enzyme particulier, découvert par A. FLEMING, en 1922 (45, 46, 47) dans le mucus nasal et les larmes, et dont la principale propriété est le pouvoir qu'il possède de lyser complètement et rapidement certaines bactéries.

Les sources actuellement connues du lysozyme sont très nombreuses :

Chez l'homme, on le trouve, non seulement, dans le mucus nasal et les larmes, mais encore dans la salive, le lait, le mucus bronchique et gastro-intestinal, les liquides synoviaux, le sperme, différents organes comme le cœur, la rate, le foie, les poumons, les reins. Il existe enfin dans le sérum sanguin.

Chez les autres mammifères, ses sources sont à peu près les mêmes. Toutefois, d'une espèce animale à l'autre, sa concentration dans un organe ou dans une sécrétion donnée peut varier largement.

Des nombreuses *plantes* étudiées jusqu'à présent, seul le navet paraît contenir des quantités appréciables de lysozyme, ces quantités étant cependant inférieures à celles qui se trouvent dans les tissus animaux normaux.

Dans quelques *souches bactériennes*, du lysozyme a également été trouvé. On a pu dire, à ce sujet, qu'il jouait un rôle important dans l'action antagoniste qu'exercent sur certaines espèces d'autres espèces bactériennes.

Ajoutons, pour terminer cette liste, qu'une source capitale de lysozyme est représentée par le blanc d'œuf.

Avant A. FLEMING, quelques auteurs, en particulier P. LASCHTSCHENKO dès 1909 (70), avaient constaté le pouvoir

bactéricide de celui-ci, mais c'est à A. FLEMING que revient le mérite d'avoir précisé la nature du principe actif. Actuellement, tous les auteurs sont d'accord pour estimer que le milieu le plus riche en lysozyme est le blanc d'œuf. Par exemple, A. FLEMING, dans son expérience princeps, indique qu'une dilution au 1/60.000 de blanc d'œuf reste encore capable de lyser, en quelques minutes, le *Micrococcus lysodeikticus*. Rappelons que ce *Micrococcus*, isolé par A. FLEMING du mucus nasal, est le germe le plus sensible à l'action du lysozyme. Comment expliquer cette grande richesse du blanc d'œuf en lysozyme ? On ne le sait pas. Mais sa présence, dans ce milieu, est certainement utile. La coquille de l'œuf est, en effet, très perméable à tous les germes du milieu ambiant et, sans l'action du lysozyme, l'œuf deviendrait rapidement une culture de bactéries. A en croire L.K. WOLFF (126), le jaune d'œuf serait aussi riche que le blanc mais son action serait inhibée par des lipides associés.

Malgré des sources aussi nombreuses et aussi variées, peut-on affirmer que, dans tous les cas, on se trouve en présence d'une seule et même substance ? On peut répondre oui sur le plan physiologique puisque tous les principes isolés ont une action identique. En revanche, d'un principe à l'autre, il existe certaines différences quant au pouvoir antigénique et à la constitution chimique.

2. — *Constitution chimique* : Cette dernière a fait l'objet depuis la découverte du lysozyme de très nombreux travaux. Actuellement, on peut dire que le lysozyme doit être classé parmi les polypeptides basiques. Son poids moléculaire se situe entre 13.000 et 15.000. En solution aqueuse acide, il est soluble, thermostable et filtrable. En solution alcaline, il est insoluble, thermolabile. Polypeptide, il se compose de nombreux acides aminés dont C. FROMAGEOT et M. DE GARILHE (49, 50), ont fait une analyse qualitative et quantitative remarquable. Cette analyse a pu être poussée jusqu'au stade ultime par P. JOLLES (61, 62, 63).

Le lysozyme est connu pour être résistant à la plupart des grands ferments protéolytiques, notamment à la trypsine. Son caractère essentiel serait d'être *mucolytique*. Autrement dit, il serait capable de détruire électivement certains constituants de ces corps complexes que sont les *mucines*.

3. — *Principales propriétés du lysozyme* :

In vitro, la propriété capitale du lysozyme se rattache à son action antibactérienne. Mais tous les germes sont loin d'être également sensibles. Une lyse spontanée, totale, comme celle observée avec le *Micrococcus lysodeikticus*, est une éventualité rare. On la retrouve seulement dans le cas de quelques germes

du type *Bacillus*. Dans la majorité des cas, si l'on veut observer une action du produit, il faut mettre en œuvre certains artifices techniques, par exemple :

- Une alcalinisation jusqu'à pH 12 du milieu dans lequel les germes et le lysozyme sont en contact [phénomène de NAKAMURA (81)] ;
- Un traitement préalable des germes par la chaleur ou l'acétone ;
- Une utilisation du tampon trihydroxyméthyl-amino-méthane de pH 8, en présence d'acide éthylènediamine tétracétique (EDTA), [technique de R. REPASKE (91)] ;
- Un traitement des germes par une résine échangeuse de cations : le dowex.

Dans ces conditions on peut obtenir une véritable lyse. Plus souvent, ce qu'on observe seulement, c'est une agglutination bactérienne en présence de fortes concentrations de lysozyme.

Il existe enfin une troisième éventualité : nous voulons parler de la formation de *protoplastes*. Ici, le travail princeps semble être celui du Microbiologiste américain C. WEIBULL (124).

Qu'est-ce qu'un *protoplaste* ? C'est une bactérie vivante, mais qui a perdu sa paroi. Les bactéries les plus sensibles semblent être le *Bacillus megatherium* et le *Bacillus anthracis*. D'autres germes, cependant, peuvent également perdre leur paroi sous l'effet du lysozyme.

Pour obtenir, en tube, des protoplastes, il convient d'opérer dans un milieu de pression osmotique particulièrement élevée, ce qui est réalisé par addition, soit de saccharose, soit de polyéthylèneglycol. La tension élevée a pour but d'empêcher la lyse des germes privés de leur paroi. Le lysozyme agit en détruisant le *mucopolysaccharide* qui forme la charpente de cette paroi. Le *mucopolysaccharide* détruit, les autres constituants qui lui étaient accolés se dissolvent dans le milieu. Les protoplastes conservent l'organisation interne, le pouvoir de synthèse, les activités biochimiques de la cellule originelle. Ainsi, *Bacillus megatherium* sous sa forme protoplaste a le même métabolisme respiratoire et il oxyde le glucose avec la même vitesse qu'un *Bacillus megatherium* normal. Les protoplastes peuvent élaborer des spores. Mais, et voici les particularités, ils ne peuvent survivre que dans un milieu de pression osmotique élevée, ils sont incapables de se mouvoir, ils sont à peu près incapables de se diviser, donc de se reproduire.

Par le pouvoir qu'il possède de « dénuder » des cellules, le lysozyme a facilité, ces dernières années, l'étude des phénomènes de perméabilité au niveau des cellules bactériennes. Il a enrichi nos connaissances en ce qui concerne la structure chimique de la paroi des bactéries. Il est aisé d'obtenir des membranes

libres (« ghosts » en anglais) qui flottent dans le milieu ambiant, en lysant des protoplastes (en les déposant, par exemple, dans un milieu de tension osmotique insuffisante).

In vivo nous nous bornerons à dire quelques mots de ses possibles applications cliniques.

Chez l'homme, le lysozyme a pu être utilisé pour le traitement de certaines infections intestinales. A ce sujet, M. MELNIK et coll. (72) ont rapporté que, dans la pratique populaire de leur pays (U.R.S.S.), on employait du blanc d'œuf de poule dissous dans de l'eau pour traiter des diarrhées infantiles estivales. Remarquons, au passage, que si le lait de femme est riche en lysozyme, celui-ci fait défaut dans le lait de vache et qu'il est bien connu que les enfants nourris artificiellement sont plus sensibles que les autres à certaines infections intestinales. On peut donc admettre que le lysozyme du lait maternel aurait, chez le nourrisson, une action anti-infectieuse.

Le lysozyme a d'autre part été employé, avec succès, dans le traitement de certaines infections oculaires. Ce serait en partie grâce au lysozyme que les muqueuses exposées à l'air (yeux, nez, bouche, poumons) restent relativement stériles. Le lysozyme serait aussi à même de prévenir les caries dentaires. Enfin, quelques auteurs lui ont reconnu des effets thérapeutiques dans l'infection pneumococcique de la souris.

4. — *Mode d'action du lysozyme* : Comment agit le lysozyme ? Les travaux de ces dernières années ont jeté toute la lumière sur la question. Le lysozyme agit en entraînant une modification de la paroi bactérienne. Cette paroi est constituée, chez toutes les bactéries, par des protéines, des lipides et des glucides, ces substances étant réparties entre les éléments d'une « charpente » constituée par un *mucopeptide*. C'est ce mucopeptide qui confère sa rigidité à la cellule bactérienne et c'est précisément sur lui que le lysozyme va se fixer.

Récemment, L. COLOBERT (22) a cru bon d'insister sur le fait que le lysozyme a un double effet, l'un spécifique, faisant intervenir son pouvoir enzymatique propre, l'autre non spécifique, tenant essentiellement à sa nature polypeptidique. Dans le second cas, le lysozyme se combine avec des substances acides présentes à la surface de la paroi. Il en résulte, à ce niveau, une neutralisation de la charge électrique. Conséquence : la suspension cesse d'être homogène. Il y a agglutination (cf. seconde éventualité dont nous avons parlé plus haut).

Toujours d'après L. COLOBERT, le second mode d'action serait à rapprocher de celui de diverses protéines basiques par exemple : la ribonucléase, la désoxyribonucléase, l'hyaluronidase, les protamines et les histones. Cependant, comme cette action n'est pas spécifique, elle n'est parfois que transitoire.

Expérimentalement, on peut la suspendre par une simple addition de sels neutres dans le milieu.

Le mécanisme enzymatique spécifique du lysozyme est la destruction de la paroi ectoplasmique de certaines bactéries puis la lyse complète de celles-ci (première éventualité). Sous certaines conditions (pression osmotique élevée), seul le premier temps existe. C'est alors que l'on aboutit à la formation de protoplastes (troisième éventualité).

5. — *Raisons de notre choix du lysozyme* : Les raisons qui ont commandé, dans notre cas, le choix du lysozyme ont été les suivantes :

- Son étonnante activité,
- Sa facilité d'emploi,
- Sa stabilité.
- Cela dit, il nous faut ajouter que, dans des expériences antérieures à celles qui seront exposées dans cette thèse, nous nous étions déjà familiarisée avec cette substance. En particulier, alors que nous cherchions à modifier le pouvoir pathogène d'un germe. On sait en effet — c'est d'ailleurs une acquisition récente — que le lysozyme peut atteindre, non seulement des saprophytes mais encore des germes pathogènes : bacille typhique, bacille para-typhique A et B, bacille dysentérique, collicabille, bacille de Koch, etc...
- Enfin, nous pouvons ajouter que le lysozyme, par sa nature chimique (polypeptide basique) se rapproche du complexe polypeptidique que nous avons appelé P II, point de départ de cette thèse.

6. — *Nature du lysozyme utilisé* : Le lysozyme que nous avons personnellement utilisé était un lysozyme de blanc d'œuf, lyophilisé, présenté en ampoules. Chacune de celles-ci contenait 100 mg de lysozyme, elles étaient conservées à + 4°. Des titrages faits périodiquement n'ont montré aucun affaiblissement dans l'activité du lysozyme ainsi conservé depuis deux ans. Le pH optimum d'action de l'enzyme étant de 6,2, toutes les solutions ont été faites dans un tampon phosphate de pH 6,2.

7. — *Titrage du lysozyme* : Pour les titrages, nous avons adopté la technique de A.N. SMOLELIS et S.E. HARTSELL (110). Cette technique repose essentiellement sur la lyse du *Micrococcus lysodeikticus*.

Obtention et mode de conservation de ce germe : Le germe est cultivé sur un milieu glucosé qui contient de la peptone de levure. Trois repiquages sont pratiqués de vingt-quatre heures en vingt-quatre heures, puis une boîte

de Roux, qui contient le même milieu, est à son tour ensemencée. La boîte est déposée dix-huit heures dans une étuve à 37°. Les germes sont récoltés en tampon phosphate de pH 6,2. Alors, ils sont ou non, lyophilisés.

Titrage du lysozyme : Des germes, lyophilisés ou non, sont mis en suspension dans le tampon de pH 6,2, de façon telle que la transmission de la lumière lue sur un spectrophotomètre soit de 10 % à 540 m μ .

De son côté, du lysozyme est dissous dans le tampon pH 6,2 de façon à obtenir une concentration de 0,7 à 25 μ g dans 5 ml de solution. A ces 5 ml de lysozyme sont ajoutés 5 ml de suspension de germes. Agitation. Après vingt minutes de contact à la température du laboratoire, les mesures optiques sont refaites. Une courbe est alors construite que l'on compare à celle obtenue avec un lysozyme accepté comme étalon.

Quand ces conditions sont respectées, on peut dire qu'une concentration de 1 à 2 μ g de lysozyme par ml est une concentration suffisante pour lyser complètement le *Micrococcus lysodeikticus* en vingt minutes à 20°.

MÉTHODES GÉNÉRALES

Mode de traitement des germes par les différentes substances.

- I. — *Les germes* : Les germes étaient conservés, à la température du laboratoire, sur gélose nutritive inclinée, et repiqués, sur même milieu, environ toutes les trois semaines.

Quarante-huit heures avant une expérience, les germes choisis étaient ensemencés sur un ou plusieurs tubes de bouillon nutritif ordinaire. Les tubes étaient déposés vingt-quatre heures dans une étuve à 37°. Au sortir de celle-ci, chaque tube de bouillon servait à ensemencer deux boîtes de Roux contenant de la gélose nutritive. C'est cette culture qui, après un séjour de vingt-quatre heures à 37°, était mise en suspension et traitée suivant les différents protocoles expérimentaux.

Mode de préparation des suspensions bactériennes : Toutes les suspensions bactériennes ont été faites suivant la même technique. Manipulations rigoureusement stériles pour l'étude des caractères de culture (chapitre III, seconde partie) et pour l'étude du pouvoir pathogène (troisième partie).

A une culture de germes en boîte de Roux, étaient ajoutés dix ml d'eau physiologique stérile. La suspension était rendue homogène à l'aide de perles de verre, et filtrée sur

gaze, afin d'éliminer les amas de germes qui auraient pu se produire. Une quantité d'eau physiologique égale à deux ou trois fois le volume initial était alors ajoutée. Centrifugation à $+ 4^{\circ}$ pendant dix minutes à 4.000 tours par minute. Décantation. Le culot était remis en suspension dans un égal volume d'eau physiologique stérile. Nouvelle centrifugation et nouveau lavage. Enfin, remise en suspension du dernier culot obtenu dans une quantité suffisante d'eau physiologique stérile de façon à amener la concentration en germes à 650×10^7 par ml.

Pour toutes nos expériences, les germes ont été utilisés *vivants*.

II. — *Les substances* : Nous indiquerons ici, pour chaque substance étudiée, la nature du solvant utilisé et la concentration du produit dans les solutions. Ces concentrations avaient été déterminées par des expériences préliminaires. Nous avons retenu la concentration qui, dans nos conditions d'expérience, exerçait l'action la plus marquée.

A) — *Fraction polypeptidique P II* : Solution à 2 mg par ml en eau physiologique, d'après la technique suivante :

La quantité nécessaire de P II était dissoute dans de l'eau physiologique (quantité d'eau physiologique un peu moindre que le volume désiré). La dissolution restait incomplète, le pH du mélange était amené aux environs de 4 par addition de quelques gouttes d'acide chlorhydrique 4 N (le nombre de gouttes ajoutées était noté). La dissolution alors obtenue, quoique plus grande, était encore incomplète. Centrifugation 10 minutes à 4.000 tours par minute. Le pH du surnageant était remonté doucement jusqu'aux environs de 6 - 6,2 (par addition de soude N, dont le volume était noté). Précipitation. Centrifugation. Le surnageant, opalescent, était ajusté au volume final par addition d'eau physiologique, compte tenu du volume d'acide chlorhydrique et de soude ajouté.

B) — *Chlorure de calcium* : Solution N en eau physiologique (dissolution très aisée).

C) — *Trypsine* : Solution à 2 mg par ml en tampon de pH 7,4 (dissolution très aisée).

D) — *Lysozyme* : Solution à 2 mg par ml en tampon de pH 6,2 (dissolution très aisée).

III. — *Traitement des germes par les différentes substances* :

Nous avons pratiqué :

soit un *traitement* des germes par les substances,

soit *deux traitements successifs*. On pouvait parler ici d'actions compétitives ou d'actions ajoutées, cela dépendait de la nature du second traitement appliqué (même substance ou substance différente).

Technique : Des fioles jaugées de 50 ml étaient montées, à l'aide de bracelets de caoutchouc, sur le portoir d'un agitateur de KAHN. Celui-ci était placé dans une étuve à 37°. Une égale quantité (généralement dans nos conditions d'expérience : 9 ml) de suspension du germe choisi, contenant 650×10^7 germes par ml et de la solution de la substance à étudier était déposée dans une fiole. Agitation sur l'agitateur pendant une heure. Centrifugation dix minutes à + 4° (4.000 tours par minute). Deux lavages par de l'eau physiologique. Enfin, le dernier culot était remis en suspension :

soit, quand il s'agissait d'un *seul traitement*, dans une quantité d'eau physiologique suffisante pour obtenir une concentration finale de germes de : 200×10^7 ,

soit, quand il s'agissait de *deux traitements successifs*, dans la quantité initiale d'eau physiologique (généralement 9 ml). A ce moment était ajoutée à cette eau, et en quantité égale, la solution de la nouvelle substance à examiner. Temps de contact une heure à 37° (avec agitation), puis centrifugation. Le culot obtenu était finalement repris par une quantité suffisante d'eau physiologique pour obtenir une concentration finale en germes de : 200×10^7 .

DEUXIÈME PARTIE

EXPÉRIENCES IN VITRO

DEUXIÈME PARTIE

CHAPITRE I

EXPERIENCES PRINCEPS

INTRODUCTION

Nous avons demandé à ces expériences de nous fournir des renseignements sur *trois points*.

1. — Nous avons dit, dans la première partie de notre exposé, que nous avions l'intention d'étudier trois germes : le staphylocoque TIN une *Salmonella typhimurium* et le *Proteus morganii*.

Nous savions déjà que les deux premiers de ces germes étaient agglutinables par des solutions de polypeptide P II. Nous ne savions pas, en revanche, si le *Proteus morganii* était agglutinable dans les mêmes conditions. Ce point, avant tout autre chose, devait être précisé

2. — De même — et c'est là le second point que nous avons à définir —, il nous a paru indispensable de savoir si le chlorure de calcium, la trypsine, le lysozyme, substances que nous avons décidé d'étudier *comparativement* avec le P II, étaient, en solution, douées ou non, elles aussi, d'une action agglutinante sur les germes retenus.
3. — Enfin, — troisième point — nous avons voulu savoir si l'action normalement exercée sur un germe par le P II était modifiée ou non quand, au préalable, le germe avait été traité par telle ou telle substance (chlorure de calcium, trypsine, lysozyme, et même P II), ce que nous avons appelé *traitement simple*, ou quand il avait subi deux traitements consécutifs par des substances différentes (*traitement double*).

PARTIE EXPÉRIMENTALE

A) — Techniques utilisées :

1. — *Préparation des suspensions microbiennes* : germes étudiés : le staphylocoque TIN, la *Salmonella typhimurium*, le *Proteus morganii*.

Les suspensions de ces germes, préparées suivant la technique indiquée dans la première partie de ce travail, contenaient 200×10^7 germes par ml. Elles n'avaient aucune tendance à s'agglutiner spontanément.

2. — *Préparation des diverses substances étudiées* :

- a) — *Solution de polypeptide P II* : Solution à 2 mg par ml en eau physiologique, préparée suivant la technique décrite dans la première partie de ce travail.
- b) — *Solution de chlorure de calcium* : Solution à 2 mg par ml en eau distillée.
- c) — *Solution de trypsine* : Solution à 2 mg par ml en tampon phosphate de pH 7,4.
- d) — *Solution de lysozyme* : Solution à 2 mg par ml en tampon phosphate de pH 6,2.

3. — *Etude du pouvoir agglutinant exercé par les diverses préparations* :

Les solutions ci-dessus étaient diluées de façon telle que 2 ml de chaque dilution, ajoutés à 1 ml d'une suspension microbienne, donnaient, dans le milieu, une concentration finale du produit égale à : 1,33 mg, 1 mg, 0,66 mg, 0,33 mg, 0,166 mg, 0,066 mg, 0,033 mg, 0,0166 mg, 0,0066 mg, 0,0033 mg, 0,00166 mg.

Le mode de préparation des différentes dilutions se trouve exposé dans le tableau n° 1.

Pour la trypsine, le liquide de dilution était le tampon phosphate de pH 7,4, pour le lysozyme, le tampon phosphate de pH 6,2.

TABLEAU N° 1

Concentration finale de produit dans le milieu	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Quantité de produit ajouté dans le milieu	1,33	1	0,66	0,33	0,166	0,066	0,033	0,0166	0,0066	0,0033	0,00165
Solution du produit à 2 mg par ml.	12	9	6	3	1,5						
Quantité prélevée dans le tube n° 3.						1,2					
Quantité prélevée dans le tube n° 4.							1,2				
Quantité prélevée dans le tube n° 5.								1,2			
Quantité prélevée dans le tube n° 6.									1,2		
Quantité prélevée dans le tube n° 7.										1,2	
Quantité prélevée dans le tube n° 8.											1,2
Eau physiologique.		3	6	9	10,5	10,8	10,8	10,8	10,8	10,8	10,8

Technique d'agglutination : Dans des tubes à hémolyse étaient réunis 1 ml d'une suspension microbienne et 2 ml d'une solution (solution de P II, de chlorure de calcium, de trypsine, de lysozyme), aux différentes dilutions choisies. Les tubes, bouchés avec du coton, étaient agités puis laissés *vingt-quatre heures* à la température du laboratoire. Le culot était alors remis en suspension par une chiquenaude donnée au fond du tube.

La suspension obtenue était-elle homogène, le résultat était dit *négalif* ; il était dit *positif*, quand des agglutinats apparaissaient dans le milieu. L'ensemble de nos résultats a été présenté sous forme de tableaux. Ils ont été notés de la façon suivante :

- une croix (+) agglutination macroscopiquement visible,
- un blanc () agglutination nulle ou du moins non visible macroscopiquement.

4. — *Recherche du pouvoir agglutinant exercé par des solutions plus ou moins diluées de P II sur des germes traités au préalable par telle ou telle substance :*

a) — *Traitement simple :* La suspension microbienne était laissée en contact avec la substance à étudier, au bain-marie agité à 37°, pendant une heure. Elle était alors centrifugée. Le culot était lavé trois fois et remis en suspension dans la quantité initiale d'eau physiologique. C'est cette suspension qui servait au test d'agglutination par P II.

b) — *Traitement double :*

— *Traitement primaire :* (cf. traitement simple).

— *Traitement secondaire :* Le second traitement était identique en tous points au premier. Seulement, il était appliqué sur les germes qui avaient déjà été soumis à un traitement primaire. Après centrifugation et lavages, le test d'agglutination par le polypeptide P II était finalement pratiqué dans les conditions habituelles.

B) — **Résultats :**

1. — *Effets exercés sur le staphylocoque TIN, la Salmonella typhimurium, et le Proteus morganii, par des solutions de P II plus ou moins diluées.*

TABLEAU N° 2

Concentration finale de P II dans le milieu	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	1,33	1	0,66	0,33	0,166	0,066	0,033	0,0166	0,0066	0,0033	0,00166	0 témoin
Staphylocoque TIN				+	+	+	+	+	+	+	+	
Salmonella typhimurium				+	+	+	+					
Proteus morganii												

La lecture de ce tableau montre — fait inattendu et sur lequel il nous faudra revenir — que *Proteus morganii* n'est pas agglutiné par les solutions de P II.

— *Traitement primaire du staphylocoque TIN par le chlorure de calcium, puis traitement secondaire par différentes substances.*

TABLEAU N° 5

Concentration finale de P II dans le milieu Nature de la substance ayant servi au traitement secondaire des germes	1	2	3	4	5	6	7	8	6	10	11	12
	1,33	1	0,66	0,33	0,166	0,066	0,033	0,0166	0,0066	0,0033	0,00166	0 témoin
P II				+	+	+	+	+	+	+	+	
Chlorure de calcium				+	+	+	+	+	+	+	+	
Trypsine	+	+	+	+	+	+						
Lysozyme		+	+	+	+	+	+	L *	L *	L *	L *	
Eau physiologique (témoin <i>t</i>), germes après le traitement primaire				+	+	+	+	+	+	+		
Rappel du témoin (<i>T</i>), germes avant tout traitement				+	+	+	+	+	+	+	+	

* L = Lyse des germes.

— *Traitement primaire du staphylocoque TIN par le lysozyme, puis traitement secondaire par différentes substances.*

TABLEAU N° 7

Concentration finale de P II dans le milieu Nature de la substance ayant servi au traitement des germes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	1,33	1	0,66	0,33	0,166	0,066	0,033	0,0166	0,0066	0,0033	0,00166	0 témoin
P II	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Chlorure de calcium					+	+	+	+	+	+		
Trypsine			+	+	+	+	+					
Lysozyme				+	+	+	+	L *	L *	L *	L *	
Eau physiologique (témoin t), germes après le traitement primaire				+	+	+	+	+				
Rappel du témoin (T), germes avant tout traitement				+	+	+	+	+	+	+	+	

* L = Lyse des germes.

b) — *La Salmonella typhimurium* :— *Traitement simple* :

TABLEAU N° 8

Concentration finale de P II dans le milieu	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Nature de la sub- stance ayant servi au traite- ment des germes	1,33	1	0,66	0,33	0,166	0,066	0,033	0,0166	0,0066	0,0033	0,00166	0 témoin
P II			+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Chlorure de calcium				+	+	+	+					
Trypsine				+	+	+						
Lysozyme				+	+							
Eau physiologique (témoin)				+	+	+	+					

— *Traitement double :*— *Traitement primaire de la Salmonella typhimurium par le P II, puis traitement secondaire par différentes substances.*

TABLEAU N° 9

Concentration finale de P II dans le milieu	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Nature de la sub- stance ayant servi au traite- ment secondaire des germes	1,33	1	0,66	0,33	0,166	0,066	0,033	0,0166	0,0066	0,0033	0,00166	0 témoin
P II			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Chlorure de calcium			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Trypsine	+											+
Lysozyme	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Eau physiologique (témoin <i>t</i>), germes après le traitement primaire			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rappel du témoin (<i>T</i>), germes avant tout traitement				+	+	+	+					

— *Traitement primaire de la Salmonella typhimurium par le chlorure de calcium, puis traitement secondaire par différentes substances.*

TABLEAU N° 10

Concentration finale de P II dans le milieu Nature de la sub- stance ayant servi au traite- ment secondaire des germes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	1,33	1	0,66	0,33	0,166	0,066	0,033	0,0166	0,0066	0,0033	0,00166	0 témoin
P II				+	+	+	+					
Chlorure de calcium				+	+	+						
Trypsine						+						
Lysozyme						+						
Eau physiologique (témoin <i>t</i>), germes après le traitement primaire				+	+	+	+					
Rappel du témoin (<i>T</i>), germes avant tout traitement				+	+	+	+					

— *Traitement primaire de la Salmonella typhimurium par la trypsine, puis traitement secondaire par différentes substances.*

TABLEAU N° 11

Concentration finale de P II dans le milieu Nature de la substance ayant servi au traitement secondaire des germes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	1,33	1	0,66	0,33	0,166	0,066	0,033	0,0166	0,0066	0,0033	0,00166	0 témoin
P II												
Chlorure de calcium				+	+	+						
Trypsine				+	+	+						
Lysozyme				+	+							
Eau physiologique (témoin t), germes après le traitement primaire				+	+	+						
Rappel du témoin (T), germes avant tout traitement				+	+	+	+					

— *Traitement primaire de la Salmonella typhimurium par le lysozyme, puis traitement secondaire par différentes substances.*

TABLEAU N° 12

Concentration finale de P II dans le milieu Nature de la substance ayant servi au traitement secondaire des germes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	1,33	1	0,66	0,33	0,166	0,066	0,033	0,0166	0,0066	0,0033	0,00166	0 témoin
P II												
Chlorure de calcium						+	+					
Trypsine						+	+	+				
Lysozyme												
Eau physiologique (témoin t), germes après le traitement primaire				+	+	+						
Rappel du témoin (T), germes avant tout traitement				+	+	+	+					

La lecture des tableaux n^{os} 3 à 17 apporte de nombreuses données. Ces données conduisent aux conclusions suivantes :

1. — *Cas du staphylocoque TIN* (Germe qui, rappelons-le, est normalement agglutiné par les solutions de P II ; concentration agglutinante maximale : 0,33 mg, concentration agglutinante minimale : 0,00166 mg).

a) — *Effets exercés par un traitement simple* (application d'une seule substance), le témoin étant représenté en ce cas par l'agglutination produite par P II, quand la substance porte son action sur des staphylocoques TIN non traités.

— *Un traitement simple par P II* a augmenté la concentration agglutinante maximale.

— *Un traitement simple par le chlorure de calcium* n'a eu aucune action.

— *Un traitement simple par la trypsine* a diminué la concentration agglutinante maximale.

— *Un traitement simple par le lysozyme* a augmenté la concentration agglutinante maximale.

b) — *Effets exercés par un traitement double* (mise en œuvre de deux substances appliquées l'une après l'autre). Ici, deux témoins ont été pris en considération :

T — agglutination des staphylocoques avant tout traitement ;

t — agglutination des staphylocoques après le premier traitement.

— *Staphylocoques TIN traités d'abord par P II* (traitement primaire).

— *Un traitement secondaire par P II ou le chlorure de calcium, ou la trypsine, ou le lysozyme* a augmenté la concentration agglutinante maximale par rapport à T. En revanche, il n'a entraîné aucune modification par rapport au témoin t.

— *Staphylocoques TIN traités d'abord par le chlorure de calcium* (traitement primaire).

— *Un traitement secondaire par P II ou le chlorure de calcium* n'a pas modifié les résultats observés par rapport à T, il a diminué la concentration agglutinante minimale.

— *Un traitement secondaire par la trypsine* a augmenté la concentration agglutinante maximale et la concentration agglutinante minimale par rapport à T et à t.

- *Un traitement secondaire par le lysozyme* a augmenté la concentration agglutinante maximale par rapport à T et à t.
Il a, en outre, fait apparaître une lyse vers les concentrations agglutinantes minimales.
 - *Staphylocoques TIN traités d'abord par la trypsine* (traitement primaire).
 - *Un traitement secondaire par P II* n'a exercé aucune action par rapport à T, il a augmenté la concentration agglutinante maximale par rapport à t.
 - *Un traitement secondaire par le chlorure de calcium* a diminué la concentration agglutinante maximale et il a augmenté la concentration agglutinante minimale par rapport à T et à t.
 - *Un traitement secondaire par la trypsine ou le lysozyme* a diminué la concentration agglutinante maximale par rapport à T.
 - *Staphylocoques TIN traités d'abord par le lysozyme* (traitement primaire).
 - *Un traitement secondaire par le P II* a augmenté la concentration agglutinante maximale par rapport à T et à t, et a diminué la concentration agglutinante minimale par rapport à t.
 - *Un traitement secondaire par le chlorure de calcium* a diminué les concentrations agglutinantes maximales par rapport à T et à t. Il a diminué la concentration agglutinante minimale par rapport à t, et augmenté la même concentration par rapport à T.
 - *Un traitement secondaire par la trypsine* a augmenté les concentrations agglutinantes maximale et minimale par rapport à T et à t.
 - *Un traitement secondaire par le lysozyme* a fait apparaître une lyse vers les concentrations agglutinantes minimales.
2. — *Cas de la Salmonella typhimurium* (germe normalement agglutiné par les solutions de P II ; concentration agglutinante maximale : 0,33 mg, concentration agglutinante minimale : 0,033 mg).
- a) — *Effets exercés par un traitement simple* (application d'une seule substance), le témoin étant représenté en ce cas par l'agglutination produite par P II quand la substance porte son action sur des *Salmonella typhimurium* non traitées.

- *Un traitement simple par P II* a diminué la concentration agglutinante minimale et augmenté la concentration agglutinante maximale.
- *Un traitement simple par la trypsine ou le lysozyme* a augmenté la concentration agglutinante minimale.
- *Un traitement simple par le chlorure de calcium* n'a exercé aucune action.

b) — *Effets exercés par un traitement double* (mise en œuvre de deux substances appliquées l'une après l'autre). Ici, deux témoins ont été pris en considération :

- T — agglutination des *Salmonella typhimurium* avant tout traitement ;
- t — agglutination des *Salmonella typhimurium* après le premier traitement.
- *Salmonella typhimurium traitées d'abord par P II* (traitement primaire).
 - *Un traitement secondaire par P II ou le chlorure de calcium* a augmenté la concentration agglutinante maximale et diminué la concentration agglutinante minimale par rapport à T ; il est resté sans effet par rapport à t.
 - *Un traitement secondaire par la trypsine* a augmenté la concentration agglutinante maximale et la concentration agglutinante minimale par rapport à T et à t.
 - *Un traitement secondaire par le lysozyme* a augmenté la concentration agglutinante maximale par rapport à T et à t, il a diminué la concentration agglutinante minimale par rapport à T.
- *Salmonella typhimurium traitées d'abord par le chlorure de calcium*.
 - *Un traitement secondaire par P II* n'a exercé aucun effet.
 - *Un traitement secondaire par le chlorure de calcium* a augmenté la concentration agglutinante minimale par rapport à T et à t.
 - *Un traitement secondaire par la trypsine ou le lysozyme* a diminué la concentration agglutinante maximale et augmenté la concentration agglutinante minimale par rapport à T et à t.

- *Salmonella typhimurium* traitées d'abord par la trypsine.
 - Un traitement secondaire par le P II a inhibé toute agglutination.
 - Un traitement secondaire par le chlorure de calcium ou la trypsine a augmenté la concentration agglutination minimale par rapport à T.
 - Un traitement secondaire par le lysozyme a augmenté la concentration agglutinante minimale par rapport à T et à t.
 - *Salmonella typhimurium* traitées d'abord par le lysozyme.
 - Un traitement secondaire par le P II ou le lysozyme a inhibé toute agglutination.
 - Un traitement secondaire par le chlorure de calcium a diminué la concentration agglutinante maximale par rapport à T et à t ; il a diminué la concentration agglutinante minimale seulement par rapport à t.
 - Un traitement secondaire par la trypsine a diminué la concentration agglutinante maximale et la concentration agglutinante minimale par rapport à T et à t.
3. — *Cas du Proteus morganii* (Germe qui, normalement, n'est pas agglutiné par les solutions de P II).
- a) — *Effets exercés par un traitement simple* (application d'une seule substance). Le témoin est ici négatif.
- Un traitement simple par P II ou le lysozyme n'a eu aucune action.
 - Un traitement simple par le chlorure de calcium a fait apparaître une zone d'agglutination (concentration agglutinante maximale : 0,66 mg, concentration agglutinante minimale : 0,0033 mg).
 - Un traitement simple par la trypsine a fait apparaître une zone d'agglutination (concentration agglutinante maximale : 0,166 mg, concentration agglutinante minimale : 0,066 mg).
- b) — *Effets exercés par un double traitement* (mise en œuvre de deux substances appliquées l'une après l'autre). Ici, nous ne pouvons faire état que d'un seul témoin qui correspond à ce qui se passe pour les germes ayant subi un premier traitement. Nous savons, en effet, que les germes non traités ne sont pas agglutinables par P II.

- *Proteus morganii* traités d'abord par P II (traitement primaire) :
 - Un traitement secondaire par P II ou le lysozyme n'a eu aucune action.
 - Un traitement secondaire par le chlorure de calcium a fait apparaître une zone d'agglutination (concentration agglutinante maximale : 0,66 mg, concentration agglutinante minimale : 0,00166 mg).
 - Un traitement secondaire par la trypsine a fait apparaître une zone d'agglutination (concentration agglutinante maximale : 1,33 mg, concentration agglutinante minimale : 0,033 mg).
- *Proteus morganii* traités d'abord par le chlorure de calcium :
 - Un traitement secondaire par P II n'a exercé aucune action.
 - Un traitement secondaire par le chlorure de calcium a augmenté la concentration agglutinante maximale et diminué la concentration agglutinante minimale.
 - Un traitement secondaire par la trypsine a diminué la concentration agglutinante minimale.
 - Un traitement secondaire par le lysozyme a augmenté la concentration agglutinante minimale.
- *Proteus morganii* traités d'abord par la trypsine :
 - Un traitement secondaire par P II a inhibé complètement l'agglutination.
 - Un traitement secondaire par le chlorure de calcium a augmenté la concentration agglutinante maximale et diminué la concentration agglutinante minimale.
 - Un traitement secondaire par la trypsine ou le lysozyme a augmenté la concentration agglutinante minimale.
- *Proteus morganii* traités d'abord par le lysozyme :
 - Un traitement secondaire par P II, ou la trypsine, ou le lysozyme est resté sans action.
 - Un traitement secondaire par le chlorure de calcium a fait apparaître une agglutination (concentration agglutinante maximale et concentration agglutinante minimale confondues : 1,33 mg).

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Au début de ce chapitre, nous avons posé les trois questions auxquelles nous entendions répondre. Voici les réponses, justifiées par les faits expérimentaux observés.

1. — Confirmant en cela nos expériences antérieures, nous avons vu que le staphylocoque TIN et la *Salmonella typhimurium* sont normalement agglutinés par des solutions du complexe polypeptidique P II.

En revanche, nous avons appris — et ce fut là, pour nous, une observation tout à fait nouvelle — que le *Proteus morganii* ne l'est pas dans les mêmes conditions.

2. — Aucune des substances simples (chlorure de calcium, trypsine, lysozyme) que nous avons l'intention d'étudier comparative-ment avec P II n'a exercé d'action agglutinante sur le staphylocoque TIN, la *Salmonella typhimurium* ou le *Proteus morganii*.

3. — Troisième réponse, enfin. Elle est plus complexe, nous devons la décomposer en trois parties.

- a) — L'agglutinabilité normale par le P II des staphylocoques TIN et des *Salmonella typhimurium* se trouve très souvent modifiée quand ces germes ont été traités au préalable (traitement simple ou traitement double) par le P II, le chlorure de calcium, la trypsine ou le lysozyme.

Au cours de nos expériences nous nous sommes trouvée ici devant neuf éventualités.

- *Première éventualité* : Il y a eu déplacement de la zone d'agglutinabilité vers les faibles concentrations, c'est-à-dire diminution des concentrations agglutinantes maximale et minimale.

Exemple : staphylocoques TIN traités par le lysozyme, puis par la trypsine.

- *Seconde éventualité* : Il y a eu déplacement de la zone d'agglutinabilité vers les fortes concentrations, c'est-à-dire augmentation des concentrations agglutinantes maximale et minimale.

Exemples : Staphylocoques TIN traités par le chlorure de calcium, puis par la trypsine.

Salmonella typhimurium traitées par P II, puis par la trypsine.

- *Troisième éventualité* : Il y a eu élargissement de la zone d'agglutinabilité vers les faibles et vers les fortes concentrations, c'est-à-dire augmentation de la concentration agglutinante maximale et diminution de la concentration agglutinante minimale.

Exemples : *Salmonella typhimurium* traitées par P II.

Salmonella typhimurium traitées par P II, puis par le chlorure de calcium.

- *Quatrième éventualité* : Il y a eu raccourcissement de la zone d'agglutinabilité au niveau des faibles concentrations ; autrement dit, si la concentration agglutinante maximale ne subissait aucun changement, il y avait augmentation de la concentration agglutinante minimale.

Exemples : Staphylocoques TIN traités par le lysozyme.

Salmonella typhimurium traitées par la trypsine, puis par le chlorure de calcium.

- *Cinquième éventualité* : Il y a eu raccourcissement de la zone d'agglutinabilité à la fois vers les fortes concentrations et vers les faibles concentrations. Autrement dit, il y a eu diminution de la concentration agglutinante maximale et augmentation de la concentration agglutinante minimale.

Exemples : Staphylocoques TIN traités par le lysozyme, puis par le chlorure de calcium.

Salmonella typhimurium traitées par le chlorure de calcium, puis par le lysozyme.

- *Sixième éventualité* : Il y a eu raccourcissement de la zone d'agglutinabilité au niveau des fortes concentrations, autrement dit, diminution de la concentration agglutinante maximale, sans changement de la concentration agglutinante minimale.

Exemples : Staphylocoques TIN traités par la trypsine, puis par le lysozyme.

Salmonella typhimurium traitées par le lysozyme, puis par le chlorure de calcium.

- *Septième éventualité* : Il y a eu élargissement de la zone d'agglutinabilité vers les fortes concentrations, autrement dit, augmentation de la concentration agglutinante maximale sans changement de la concentration agglutinante minimale.

Exemples : Staphylocoques TIN traités par le P II.
Staphylocoques TIN traités par P II, puis par la trypsine.

- *Huitième éventualité* : Il n'y a eu aucun changement dans l'agglutinabilité.

Exemples : Staphylocoques TIN traités par la trypsine puis par le P II.

Salmonella typhimurium traitées par le chlorure de calcium, puis par le P II.

- *Neuvième éventualité* : Il y a eu suppression de l'agglutination normale. On se retrouvait alors en présence de la première ou de la seconde éventualité.

Exemples : *Salmonella typhimurium* traitées par la trypsine, puis par P II.

Salmonella typhimurium traitées par le lysozyme, puis par le lysozyme.

- b) — Dans un cas — ce cas était offert par le staphylocoque TIN — le phénomène que nous avons pu constater après traitement double du germe, soit par le chlorure de calcium, puis par le lysozyme, soit par le lysozyme appliqué à deux reprises, était, non plus une agglutination, mais une lyse.
- c) — Enfin, dernière observation, et peut-être la plus importante de toutes, le *Proteus morganii*, germe qui, normalement, n'est pas agglutinable par le complexe polypeptidique P II, le devient quand, au préalable, il a subi un traitement simple par le chlorure de calcium ou la trypsine. Ces deux substances, toutefois, n'ont que peu ou pas d'action quand, au cours d'un traitement double, elles se trouvent utilisées après le lysozyme.

Cela dit — et qui pourrait paraître au lecteur assez confus — il conviendrait naturellement d'interpréter nos résultats pour bien montrer leur intérêt. Nous aurions pu le faire ici. Mais, après réflexion, il nous a paru plus logique de réserver cet essai d'interprétation pour un chapitre à part qui aurait place après l'exposé de nos autres résultats.

Ce chapitre à part constitue, dans cette thèse, le chapitre VII (seconde partie).

DEUXIÈME PARTIE

CHAPITRE II

LES MODIFICATIONS MORPHOLOGIQUES

INTRODUCTION

Nous avons vu, dans le chapitre précédent, que les suspensions de certaines bactéries (staphylocoques TIN, *Salmonella typhimurium*) sont agglutinées par la mise en contact d'un complexe polypeptidique, étiqueté par nous P II.

Nous avons vu aussi qu'un traitement préalable des bactéries par certaines substances (chlorure de calcium, trypsine, lysozyme) pouvait modifier l'agglutinabilité normale. Celle-ci tantôt augmente, tantôt diminue d'intensité. Dans un cas même, nous avons vu qu'un traitement préalable adéquat pouvait rendre agglutinable une bactérie (*Proteus morganii*) qui, normalement, ne l'est pas.

Il nous a paru intéressant de savoir — nouvelle étape de notre travail — si un traitement par P II entraînait également pour la bactérie, des modifications morphologiques décelables au microscope optique, si des modifications étaient aussi perceptibles, soit après une application simple de chlorure de calcium, de lysozyme ou de trypsine, soit après deux traitements successifs (par exemple, par le chlorure de calcium, puis par le polypeptide P II) des mêmes bactéries.

Les observations que nous avons pu faire, dans ces conditions, forment précisément l'objet de ce second chapitre.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

A) — Techniques :

1. — *Germes retenus* : Nous avons retenu les trois germes habituels, c'est-à-dire le staphylocoque TIN, une *Salmonella typhimurium*, le *Proteus morganii*. Ces germes ont été examinés à l'état normal ou après avoir été traités, comme nous l'avons dit dans notre introduction, par différentes substances.

2. — *Traitements appliqués* :

a) — *Traitement simple* : les suspensions de germes étaient déposées dans une solution de P II, ou de chlorure de calcium, ou de trypsine, ou de lysozyme, au bain-marie agité à 37°, pendant une heure (*). Les germes étaient ensuite recueillis, lavés, examinés à l'état frais entre lame et lamelle, ou encore colorés après étalement sur lames. (Pour plus de détails, se reporter aux indications générales fournies dans la première partie de ce travail).

b) — *Traitement double* : Dans un premier temps, les germes étaient laissés en contact pendant une heure (à 37°) dans la solution à tester (P II, chlorure de calcium, trypsine, lysozyme) (*) puis, après lavages soigneux, ils étaient maintenus pendant une heure également dans une solution différente (P II, chlorure de calcium, trypsine ou lysozyme) (*). A ce moment, comme pour le traitement simple, ils étaient lavés et examinés comme ci-dessus. (Pour plus de détails, se reporter aux indications générales fournies dans la première partie de ce travail).

3. — *Modes d'examen* :

a) — *Examen à l'état frais* : Une goutte d'une suspension de germes, normaux ou différemment traités, était déposée entre lame et lamelle. L'examen microscopique était pratiqué à l'aide du contraste de phase.

(*) Concentration finale dans le milieu : P II, trypsine, lysozyme : 1 mg par ml ; chlorure de calcium : M/2.

b) — *Examen après colorations :*— *Coloration par le bleu de KUHN :*— *Préparation du colorant :*

Bleu de méthylène	1,50 g
Acide phénique neigeux	1 g
Alcool absolu	10 ml
Eau distillée	90 ml

Le bleu de méthylène est broyé, dans un mortier, avec l'alcool. L'acide phénique est ajouté, en broyant toujours, puis l'eau distillée est versée par petites portions. Le mélange, après avoir été laissé une nuit au repos, est filtré sur papier.

— *Mode d'emploi du colorant :*

Une goutte de suspension de germes normaux ou traités est étalée sur une lame propre et dégraissée. Après dessiccation, fixation par la chaleur. Coloration par le bleu de KUHN pendant trois minutes. Le colorant est rejeté et la lame rincée abondamment par de l'eau distillée. Séchage entre deux feuilles de papier buvard. Examen microscopique avec un objectif à immersion.

— *Coloration de MAY-GRUNWALD GIEMSA :*— *Préparation des colorants :*

La solution de MAY-GRUNWALD et la solution de GIEMSA sont des colorants R.A.L., préparés par la Maison KUHLMANN. La première s'emploie pure, la seconde diluée, au moment de la coloration, à raison de trois gouttes pour 1 ml d'eau neutre.

— *Préparation de l'eau neutre :*

Afin d'obtenir de bonnes colorations, il est indispensable d'utiliser une eau chimiquement neutre.

De l'eau distillée est mise à bouillir pendant dix minutes (afin d'éliminer l'anhydride carbonique). Après refroidissement, neutralisation par du carbonate de sodium à 1 %, en présence de quelques gouttes de rouge neutre jusqu'à coloration jaune pâle persistante.

— *Mode d'emploi des colorants :*

Une goutte de suspension de germes normaux ou traités est étalée sur une lame propre et dégraissée. Dessiccation à l'air. X gouttes de solution de MAY-GRUNWALD après avoir été

déposées sur la lame, y sont laissées *trois minutes*. Sans rejeter le colorant, X gouttes d'eau neutre sont ajoutées. Le mélange est agité par un mouvement de rotation de la lame, et laissé au repos *trois minutes*. A ce moment, le colorant est rejeté et, sans rinçage, XX gouttes de solution de GIEMSA diluée sont versées sur la lame. Contact *douze minutes*. La lame est rincée abondamment par de l'eau distillée puis séchée entre deux feuilles de papier buvard. Pendant toute la durée de la coloration, la lame est placée sous un couvercle de boîte de PETRI afin d'éviter l'évaporation des colorants.

B) — Résultats :

Examens à l'état frais. Ils n'ont pas donné de résultat. Aucune modification n'a pu être observée sur les germes traités par comparaison avec des germes normaux. Parfois, seulement, il y avait tendance, après traitement, à une certaine agglutination. Nous reviendrons sur ce point dans notre discussion.

Examens après colorations. Ici, les résultats observés ont été nettement positifs. Les deux techniques utilisées ont donné des résultats sensiblement du même ordre. Toutefois, après coloration par le MAY-GRUNWALD GIEMSA, il a été possible de relever plus de détails. Ce sont donc les résultats obtenus par cette méthode qui sont exposés dans les tableaux n^{os} 18 à 23.

1. — Observations faites avec le staphylocoque TIN :

a) — Germes soumis à un traitement simple :

TABLEAU N° 18

Nature de la substance ayant servi au traitement	Aspect des germes
Eau physiologique (témoin)	Aspect normal : cocci aux bords nets, en amas.
P II	Cocci anormalement gros, aux limites floues.
Chlorure de calcium	Aspect normal.
Trypsine	Aspect normal.
Lysozyme	Aspect normal.

b) — *Staphylocoques TIN soumis à un double traitement :*

TABLEAU N° 19

Nature de la substance ayant servi au premier traitement Nature de la substance ayant servi au traitement secondaire des germes	P II	Chlorure de calcium	Trypsine	Lysozyme
Eau physiologique (témoin)	Cocci anormalement gros, aux limites floues.	Cocci aux bords nets, en amas.	Cocci aux bords nets, en amas.	Cocci aux bords nets, en amas.
P II	Id.	Cocci donnant l'impression d'être vidés de leur substance. Au moins 50 % de formes non reconnaissables. Très agglutinés.	Cocci très polymorphes, agglutinés, pâles.	Cocci très agglutinés, polymorphes.
Chlorure de calcium	Id.	Cocci de taille très différente, leur forme n'est plus parfaitement sphérique. Bords flous.	Cocci de taille différente, ne sont plus parfaitement sphériques.	Cocci aux bords nets, en amas.
Trypsine	Id.	Id.	Id.	Cocci très polymorphes, ne sont plus sphériques.
Lysozyme	Id.	Très pâles. Informes, ne sont plus sphériques. Limites floues.	Id. En outre, germes agglutinés.	Taille des cocci très différente, variant de 1 à 3 environ.

2. — *Observations faites avec Salmonella typhimurium* :a) — *Germes soumis à un traitement simple* :

TABLEAU N° 20

Nature de la substance ayant servi au traitement	Aspect des germes
Eau physiologique (témoin)	Aspect normal : bâtonnet fin à bouts arrondis.
P II	Bacilles agglutinés, très polymorphes.
Chlorure de calcium	30 à 40 % des bacilles sont granuleux.
Trypsine	Aspect normal.
Lysozyme	Aspect normal.

b) — *Salmonella typhimurium* soumises à un double traitement :

TABLEAU N° 21

Nature de la substance ayant servi au premier traitement Nature de la substance ayant servi au traitement secondaire des germes	P II	Chlorure de calcium	Trypsine	Lysozyme
Eau physiologique (témoin)	Bacilles agglutinés très polymorphes.	30 % des bacilles sont granuleux.	Bacilles d'aspect tout à fait normal.	Bacilles d'aspect tout à fait normal.
P II	Quelques bacilles sont granuleux. Tous sont agglutinés.	50 % des bacilles sont granuleux.	100 % des bacilles sont granuleux.	Bacilles anormalement polymorphes.
Chlorure de calcium	100 % des bacilles sont granuleux.	50 % des bacilles sont granuleux.	30 % des bacilles sont granuleux.	Bacilles identiques aux témoins.
Trypsine	Bacilles identiques aux témoins.	Bacilles identiques aux témoins.	Bacilles identiques aux témoins.	Bacilles anormalement polymorphes.
Lysozyme	Bacilles très abîmés, formés peu reconnaissables.	Id.	80 à 90 % des bacilles sont granuleux.	Bacilles agglutinés très polymorphes. 40 % de formes reconnaissables.

3. — Observations faites avec le *Proteus morganii* :

a) — Germes soumis à un traitement simple :

TABLEAU N° 22

Nature de la substance ayant servi au traitement	Aspect des germes
Eau physiologique (témoin)	Aspect normal : très petits bacilles, trapus.
P II	Aspect normal.
Chlorure de calcium	Aspect normal.
Trypsine	Aspect normal.
Lysozyme	Aspect normal.

b) — *Proteus morganii* soumis à un double traitement :

TABLEAU N° 23

Nature de la substance ayant servi au premier traitement Nature de la substance ayant servi au traitement secondaire des germes	P II	Chlorure de calcium	Trypsine	Lysozyme
Eau physiologique (témoin)	Très petits bacilles trapus.	Très petits bacilles trapus.	Très petits bacilles trapus.	Très petits bacilles trapus.
P II	Id.	Grand polymorphisme. Germes pratiquement informes, très agglutinés.	Id.	Bacilles très agglutinés, anormalement gros.
Chlorure de calcium	Id.	Très petits bacilles trapus.	Id.	Très petits bacilles trapus.
Trypsine	Bacilles polymorphes légèrement altérés.	Id.	Id.	Id.
Lysozyme	Bacilles plus gros et plus trapus.	Id.	Grand polymorphisme. Certains germes (40 %) sont devenus cocciformes.	Grand polymorphisme. Bacilles plus gros que normalement.

Nous résumerons, sous la forme suivante, les indications fournies par la lecture des six tableaux précédents.

1. — *Germes soumis à un traitement simple :*

- a) — *Un traitement par P II* n'a paru exercer aucune action sur la morphologie de *Proteus morganii*. En présence du même produit, les staphylocoques sont devenus plus volumineux, les *Salmonella typhimurium* se sont agglutinées en accusant beaucoup leur polymorphisme.
- b) — *Le traitement par le chlorure de calcium* n'a pas altéré la morphologie des staphylocoques et des *Proteus morganii*. En revanche, il a rendu granuleuses 30 à 40 % des *Salmonella typhimurium*.
- c) — *Traitement par la trypsine*. L'action de cette substance sur la morphologie des trois germes a été nulle.
- d) — *Traitement par le lysozyme* : Idem.

2. — *Germes soumis à un traitement double :*

- a) — *Après traitement primaire par le P II :*
 - *Un traitement secondaire par la même substance* a respecté la morphologie des staphylocoques et des *Proteus morganii*. En revanche, il a entraîné une agglutination de *Salmonella typhimurium* ; quelques bactéries sont devenues granuleuses.
 - *Un traitement secondaire par le chlorure de calcium* a conduit à peu près aux mêmes effets. Atteinte comparativement plus marquée, cependant, des *Salmonella typhimurium* ; toutes sont devenues granuleuses.
 - *Un traitement secondaire par la trypsine* n'a exercé aucune action sur la morphologie des staphylocoques et des *Salmonella typhimurium*. Il a altéré légèrement les *Proteus morganii* qui sont devenus anormalement polymorphes.
 - *Un traitement secondaire par le lysozyme* n'a eu aucune action sur les staphylocoques. Il a rendu les *Proteus morganii* plus volumineux et plus trapus. Il a altéré fortement les *Salmonella typhimurium* ; ces germes étaient devenus difficiles à reconnaître.
- b) — *Après traitement primaire par le chlorure de calcium :*
 - *Un traitement secondaire par le P II* a modifié profondément la morphologie des germes : 50 % des staphylocoques ne pouvaient plus être reconnus, les autres

étaient très agglutinés ; 50 % des *Salmonella typhimurium* étaient granuleuses. Les *Proteus morganii* étaient informes et très agglutinés.

- *Un traitement secondaire par le chlorure de calcium* n'a eu aucune action sur la morphologie des *Proteus morganii*. Il a profondément altéré, en revanche, la forme des staphylocoques (les germes sont devenus anormalement gros ou petits) ; 50 % des *Salmonella typhimurium* étaient, elles aussi, devenues granuleuses.
- *Un traitement secondaire par la trypsine ou le lysozyme* n'a eu aucune action sur la morphologie des *Salmonella typhimurium* et des *Proteus morganii*. Les staphylocoques, comme cela se passe après un traitement secondaire par le chlorure de calcium, avaient des bords flous et une taille anormalement variable (ils étaient très petits ou très volumineux).

c) — *Après traitement primaire par la trypsine :*

- *Un traitement secondaire par P II* n'a eu aucune action sur les *Proteus morganii*. En revanche, après le traitement en question, toutes les *Salmonella typhimurium* étaient granuleuses, les staphylocoques étaient très polymorphes et agglutinés.
- *Un traitement secondaire par le chlorure de calcium* n'a eu aucune action sur les *Proteus morganii*. En revanche, après traitement, 30 % des *Salmonella typhimurium* sont devenues granuleuses, les staphylocoques étaient polymorphes avec des contours flous.
- *Un traitement secondaire par la trypsine* a rendu les staphylocoques polymorphes. En revanche, il n'a entraîné aucune action sur *Salmonella typhimurium* et *Proteus morganii*.
- *Un traitement secondaire par le lysozyme* a modifié tous les germes : les staphylocoques sont devenus très polymorphes et ils étaient agglutinés ; 80 à 90 % des *Salmonella typhimurium* étaient granuleuses. Les *Proteus morganii* étaient devenus, eux aussi, très polymorphes ; 40 % d'entre eux avaient pris l'aspect de cocci.

d) — *Après traitement primaire par le lysozyme :*

- *Un traitement secondaire par P II* a modifié les germes. Tous sont devenus plus polymorphes ; les staphylocoques et les *Proteus morganii* étaient, en outre, agglutinés.

- Un traitement secondaire par le chlorure de calcium est resté sans action.
- Un traitement secondaire par la trypsine, s'il est resté sans action sur le *Proteus morganii*, a rendu les *Salmonella typhimurium* un peu plus polymorphes et a altéré légèrement la sphéricité des staphylocoques.
- Un traitement secondaire par le lysozyme, enfin, a modifié tous les germes, à des degrés divers toutefois. Les *Salmonella typhimurium* étaient les plus touchées, 40 % des germes seulement étaient reconnaissables, la taille des staphylocoques était devenue variable. Les *Proteus morganii* étaient un peu plus polymorphes.

DISCUSSION

1. — Principaux résultats observés :

- a) — L'examen à l'état frais, entre lame et lamelle, des germes qui avaient été traités au préalable par le polypeptide P II, le chlorure de calcium, le lysozyme ou la trypsine, n'a pas permis de mettre en évidence d'importantes modifications morphologiques. Au mieux, ce que nous avons constaté, c'est une agglutination anormale des germes, ceux-ci étant réunis en amas plus ou moins importants. Exemples : staphylocoques traités par la trypsine, puis par le P II, staphylocoques traités par le lysozyme puis par P II, *Salmonella typhimurium* traitées à deux reprises par le P II ou le lysozyme, *Proteus morganii* traités par le chlorure de calcium puis par P II, *Proteus morganii* traités par le lysozyme puis par P II.
- b) — Examen après coloration, soit par le bleu de KUHN, soit par le MAY-GRUNWALD GIEMSA.
 - Quand les germes étudiés, staphylocoques TIN, *Salmonella typhimurium*, *Proteus morganii* avaient été soumis à un traitement simple (par le P II, ou le chlorure de calcium, ou la trypsine, ou le lysozyme), les modifications subies par eux demeuraient très peu marquées. Très souvent, l'observation n'indiquait rien. Seulement dans quelques cas, les germes étaient altérés.

Exemples : Les staphylocoques traités par P II sont anormalement volumineux et leurs contours sont devenus flous. Les *Salmonella typhimurium* traitées par le chlorure de calcium sont granuleuses, au moins dans une proportion de 50 %.

- *Après traitement double*, en revanche, par exemple : chlorure de calcium puis P II, ou chlorure de calcium puis lysozyme, les altérations que nous avons pu voir, n'ont fait, pour ainsi dire, jamais défaut. Cependant, elles différaient largement en gravité : elles pouvaient être légères, marquées, ou très marquées.

Des altérations légères se caractérisaient par un polymorphisme anormal qui se traduisait : soit par une augmentation de la taille des bactéries, soit par l'apparition, dans certaines espèces, de formes longues ou de chaînettes.

Exemples : Staphylocoques traités par le lysozyme puis par P II, *Salmonella typhimurium* traitées par le lysozyme puis par la trypsine, *Proteus morganii* traités par le P II puis par la trypsine. Tous ces germes apparaissaient nettement plus polymorphes que des germes normaux.

Des altérations marquées se caractérisaient par une augmentation de la transparence des bactéries, celle-ci faisant apparaître dans le corps bactérien, des granulations.

Exemples : *Salmonella typhimurium* traitées par le P II puis par le chlorure de calcium, *Salmonella typhimurium* traitées par la trypsine puis par le P II. (Nous tenons ici à faire remarquer que les germes granuleux sont encore capables, du moins pour la majorité d'entre eux, de se multiplier sur les milieux usuels. Nous donnerons tous les détails à ce sujet dans le chapitre III, seconde partie de ce travail).

Des altérations très marquées enfin conduisaient généralement à l'obtention d'une image floue dans laquelle seule la forme de quelques bactéries pouvait être reconnue. Les germes semblaient comme vidés de leur substance.

Exemples : staphylocoques traités par le chlorure de calcium puis par le lysozyme, *Salmonella typhimurium* traitées par P II puis par le lysozyme, *Proteus morganii* traités par le chlorure de calcium puis par le P II. (A signaler, là encore, que tous ces germes morphologiquement si altérés, restent néanmoins capables de se multiplier ; nous aurons à revenir sur ce point dans le chapitre III de la seconde partie de ce travail).

2. — Comparaison des résultats que nous venons d'exposer avec ceux recueillis par d'autres auteurs :

a) — Résultats obtenus avec des substances voisines de celles utilisées par nous :

— *Trypsine* : W.E. ENGELHARD et coll., en 1957 (42), comme ils étudiaient la perméabilité de certaines mycobactéries ont constaté que ces germes, quand ils étaient entrés en contact, pendant cinq heures à 37°, avec une solution de trypsine dans le tampon phosphate de SÖRENSEN, étaient souvent gonflés.

M.D. SLADE, en 1957-58 (99), examinant au microscope électronique l'action de la trypsine et du cétab (bromure de cétyltriméthyllammonium) sur *Streptococcus pyogenes* n'a pas remarqué de modification morphologique du germe après action isolée de ces substances. Après action simultanée, il y avait modification de la perméabilité de la cellule bactérienne qui pouvait être mise en évidence par l'étude de différents métabolismes.

En 1960, E.N. FOX et D. STEVENSON (48) ont confirmé en quelque sorte les résultats de M.D. SLADE. Ayant traité, pendant trente minutes à 37°, des streptocoques A hémolytiques par la trypsine, ils ont constaté que les modifications morphologiques faisaient défaut, mais que la perméabilité des germes était augmentée pour des métabolites variés (glucose, adénosine triphosphate, acides aminés, peptides, ions métalliques divalents...).

— *Lysozyme* : On sait qu'une des grandes propriétés de cet enzyme est d'entraîner la formation de protoplastes. Nous nous sommes étendue sur ce sujet dans la première partie de ce travail. Il ne nous paraît pas utile d'y revenir. En revanche, nous devons donner, ici même, quelques indications particulières.

G.H. WARREN et J.G. DURSO, en 1952 (123), ayant mis du lysozyme (2 mg par ml) au contact d'*Achromobacter fischeri*, ont observé un élargissement du germe et l'apparition de formes en sphère ou en fuseau. Après coloration les germes présentaient en petit nombre une coloration bipolaire avec un centre clair.

En 1953, Q.N. MYRVIK et coll. (80), ont remarqué que, l'application, pendant vingt-quatre à soixante-douze heures, d'une concentration de lysozyme de l'ordre de 2.000 µg par ml, produisait des effets cytologiques marqués sur les cellules jeunes des souches

BCG et Ravenel du *Mycobacterium tuberculosis*, variété *bovis*. Les modifications produites, examinées au microscope électronique, consistaient en une lobulation et en une augmentation marquée de la densité du cytoplasme avec perte des membranes cellulaires. Les résidus cytoplasmiques étaient insolubles et conservaient leur propriété d'acido-résistance. Sur *Mycobacterium tuberculosis* variété *avium*, quand il était soumis au même traitement, les changements observés étaient moins marqués.

En 1957, enfin, L. COLOBERT (21), appliquant des concentrations élevées de lysozyme sur des salmonelles, a pu observer un gonflement de la paroi externe des germes.

b) — *Résultats obtenus avec des substances différentes de celles utilisées par nous :*

Nous ne dirons rien des *antibiotiques* car ce serait déborder beaucoup trop largement notre sujet. En revanche, nous croyons nécessaire de mentionner diverses observations faites avec des sels, des alcaloïdes, des extraits tissulaires enfin.

— *Sels* : En 1960, T. KAWATA et coll. (66), ayant ajouté à une culture de *Bacillus megatherium* sur hydrolysate sucre-caséine du tellurite de potassium (concentration finale : 0,05 %), ont observé l'apparition de corps sphériques, qui contenaient des dépôts de tellurite.

— *Alcaloïdes* : En 1953, J. BERNARD (7), étudiant l'action de nombreux alcaloïdes sur différents germes, a pu noter, après traitement par la scurocaïne ou le sulfate d'hyosciamine, que des staphylocoques devenaient, au contact de ces produits, anormalement volumineux. Après traitement par le chlorhydrate d'harmine, se formaient des granulations dans le corps du *Bacillus proteus* X 19.

— *Extraits tissulaires* :

— *Histones* : J.G. HIRSCH, en 1958 (57), a signalé que l'addition à des cultures de moins de 1 µg d'une fraction d'histone riche en arginine extraite du thymus de veau et appelée histone B, pouvait tuer certaines bactéries (*Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, et *Micrococcus pyogenes* var. *albus*), cela sans provoquer de changements morphologiques ou de lyse.

Il a cité, parmi les germes résistants, les *Proteus*.

— *Protamine* : En 1961 (77) et 1962 (78), G. MOUSTARDIER et coll., ont remarqué que l'adjonction de faibles quantités de sulfate de protamine à des cultures microbiennes en bouillon nutritif, entraînait un arrêt de la croissance des germes, et des modifications morphologiques importantes. Les staphylocoques, les colibacilles, et les *Proteus*, soumis à l'action de la protamine, donnaient naissance à des éléments arrondis de forte taille qui ressemblaient à des sphéroplastes tandis que, le long des parois du *Bacillus megatherium*, apparaissaient de petites formations sphériques. Utilisant dans d'autres expériences, un milieu standardisé, les auteurs ont été capables d'induire la production de formes anormales à partir de deux souches de staphylocoques, de *Bacillus megatherium*, d'*Escherichia coli*, de *Bacillus mesentericus*. Ces formes anormales, qu'ils ont appelées « *Protoplastes* », ressemblaient beaucoup à celles produites par action du lysozyme ou de la pénicilline. Elles en différaient, cependant, par leur résistance aux différences de pression osmotique, leur réversibilité d'autant plus difficile que le traitement avait été plus prolongé, leur longévité enfin.

Ajoutée au milieu dès le moment de l'ensemencement, l'héparine pouvait s'opposer à l'induction du phénomène. Ajoutée plus tardivement, une quantité minime du même corps parvenait à éclaircir complètement le milieu, cet éclaircissement correspondant à la disparition des proto-plastes.

Aurait-on le droit de rapprocher des diverses observations que nous venons de rapporter celles que nous avons faites nous-même ? Nous le croyons. Dans tous les cas, ne voyons-nous pas signalés, avant toute chose, le polymorphisme bactérien et l'apparition de granules ?

3. — *Signification et causes des modifications morphologiques observées :*

Signification ? De telles modifications ne peuvent qu'exprimer une souffrance de la cellule bactérienne. On devrait les voir apparaître chaque fois que la cellule en question se trouve maintenue dans des conditions défavorables. Mais, à la vérité, c'est bien là ce qui semble se produire.

Un important travail de L. COLOBERT paru en 1958 (23) mérite tout particulièrement, d'être cité ici. Cet auteur avait voulu

déterminer l'action sur des bactéries du vieillissement, de différentes radiations, d'un chauffage modéré, de solutions salines diverses de concentration ionique défavorable, l'action aussi de détergents (anioniques : déhydrocholate de sodium, teepol, tergitol ; cationique : ammonium quaternaire ; neutre : saponine...) ou encore d'enzymes (trypsine, pepsine, papaïne, lysozyme, l'action de ceux-ci ne pouvant s'exercer qu'après sensibilisation préalable des bactéries par la chaleur).

Au cours de ses études, il a pu remarquer que, lorsque le traitement avait été assez modéré pour respecter les grandes fonctions physiologiques des germes, l'apparition d'altérations morphologiques ne manquait jamais de se produire. Notamment, il y avait toujours formation de granulations. Pour cette raison, L. COLOBERT a admis qu'une structure granulaire doit préexister dans toute bactérie, mais que cette structure ne peut être mise en évidence qu'après traitement approprié. L. COLOBERT a également pensé que les granulations en question ne doivent pas être sensiblement différentes des formations considérées par S. MUDD (79) comme des mitochondries, par K.A. BISSET (8) comme des artefacts, par J.R.C. BRADFIELD (15) comme des grains de volutine et par G. KNAYSI (67) comme le noyau bactérien.

Nous nous rangerions volontiers à ses côtés. Au demeurant, d'autres auteurs, avant même L. COLOBERT, avaient déjà eu à signaler diverses altérations morphologiques sur des bactéries cultivées dans des conditions défavorables, ou encore soumises à un chauffage. Par exemple, en 1951, H. STEMPEL et coll. (115, 116) ont signalé l'apparition spontanée de granulations dans les cultures de *Proteus vulgaris* X 19. Également, en 1951, M.R.J. SALTON et R.W. HORNE (93), ayant chauffé des suspensions de *Escherichia coli*, *Salmonella pullorum*, *Streptococcus faecalis*, *Pseudomonas fluorescens* et *Pseudomonas pyocyanea*, au bain-marie à diverses températures, ont constaté qu'il y avait, au-dessous de 70°, apparition de granules avec amenuisement des germes et, au-dessus de 70°, rupture des parois cellulaires.

Enfin, J. VIGOUROUX et C. HANNOUN, dans deux revues générales parues en 1956 (121) et 1957 (122) ont eu à décrire eux aussi un stade granulaire. Les granulations observées étaient capables de se multiplier et elles avaient un pouvoir pathogène (d'où rapprochement naturel avec les formes L des bactéries).

Tout cela connu, nous arrivions à cette conclusion : Polymorphisme et apparition de granules, tels que nous avons pu le constater dans nos propres expériences, traduisent certainement un état de souffrance bactérienne.

Maintenant, quelles pourraient être les *causes* de cette souffrance ?

Pourquoi des bactéries recouvertes du complexe polypeptidique P II, surtout quand l'action de celui-ci a été renforcée encore par une application préalable de chlorure de calcium, de lysozyme ou de trypsine souffrent-elles ?

La réponse manifestement est difficile.

Une action spécifique paraît peu probable (spécifique comme l'est celle du lysozyme).

Des actions non spécifiques diverses paraissent, en revanche, fort vraisemblables. Ce qu'elles pourraient être, nous nous réservons cette fois encore de le dire dans un chapitre général (chapitre VII, seconde partie de ce travail).

4. — *Colorabilité par la méthode de GRAM :*

Systématiquement, nous avons pratiqué sur des germes normaux et sur des germes traités une coloration de GRAM, suivant la technique classique.

Dans aucun cas, nous n'avons pu déceler de changement notable. Les staphylocoques une fois traités par le complexe polypeptidique P II, étaient peu colorés, mais on ne pouvait pas dire qu'ils étaient devenus GRAM négatif.

DEUXIÈME PARTIE

CHAPITRE III

MODIFICATIONS DES CARACTÈRES DE CULTURE

INTRODUCTION

Dans le chapitre II de la seconde partie de ce travail, nous avons étudié la morphologie de germes normaux ou de germes qui avaient été traités, dans différentes conditions, par le polypeptide P II, le lysozyme, la trypsine ou le chlorure de calcium.

Ont pu être observées alors diverses altérations morphologiques :

- tantôt légères, se traduisant par un polymorphisme microbien ;
- tantôt marquées (apparition de granules intracellulaires) ;
- tantôt très marquées (apparition de masses floues, dans lesquelles la forme normale des bactéries se reconnaissait avec peine).

Les germes altérés gardaient-ils leur pouvoir de reproduction dans les milieux usuels ?

Gardaient-ils leurs caractères propres sur milieux d'identification ?

Gardaient-ils, enfin, leurs propriétés biochimiques ?

Nous avons voulu aussi répondre à ces questions, les faits que nous avons trouvés, au cours de nos expériences, sont rapportés dans ce nouveau chapitre.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

A) — Techniques :

1. — *Préparation des germes* : Les trois germes étudiés ont, comme chaque fois, été : le staphylocoque TIN, la *Salmonella typhimurium*, le *Proteus morganii*.

a) — *Utilisation de germes normaux* : Les germes vivants étaient lavés plusieurs fois avec de l'eau physiologique, et le dernier culot était remis en suspension dans une quantité d'eau physiologique suffisante pour obtenir une concentration en germes de 200×10^7 par ml.

b) — *Utilisation de germes traités* :

— *Traitement simple* : Les suspensions de germes vivants étaient mises en contact pendant une heure, dans un bain-marie agité à 37° , avec des solutions de P II, de chlorure de calcium, de trypsine ou de lysozyme (concentration finale des substances dans le milieu : P II, trypsine, lysozyme : 1 mg par ml, chlorure de calcium : M/2). Les germes étaient ensuite recueillis par centrifugation, lavés et remis en suspension dans une quantité suffisante d'eau physiologique pour obtenir une concentration en germes de 200×10^7 par ml.

— *Traitement double* : Dans un premier temps, les germes étaient laissés en contact, pendant une heure à 37° , avec les solutions à tester (P II, chlorure de calcium, trypsine, lysozyme ; concentration finale de ces substances dans le milieu : P II, trypsine, lysozyme : 1 mg par ml, chlorure de calcium : M/2), puis, après lavages soigneux, ils étaient de nouveau mis en contact, pendant une heure avec des solutions différentes (P II, trypsine, lysozyme, chlorure de calcium aux mêmes concentrations que pour le premier temps). A ce moment, comme pour le traitement simple, les germes étaient lavés et le dernier culot remis en suspension dans une quantité d'eau physiologique suffisante pour obtenir une concentration en germes de 200×10^7 par ml.

Tous les détails concernant ces différents traitements ont été donnés dans la première partie de ce travail. Le lecteur, au besoin, pourra s'y reporter.

2. — *Milieux utilisés :*a) — *Milieux usuels :*

— *Bouillon nutritif ordinaire* : Il était préparé, au laboratoire, suivant la technique décrite ci-dessous :

Produits nécessaires :

Chlorure de sodium pur cristallisé de la	
Maison PROLABO	5, 6 g
Extrait de viande pour bactériologie, C ¹⁶	
F ^{sc} des produits LIEBIG	10 g
Peptone bactériologique, VAILLANT. Pro-	
duits physiologiques et organiques....	25 g
Eau distillée, q.s.p.	1 litre

Technique :

L'eau est chauffée doucement jusqu'à 80° environ. Le chlorure de sodium est alors ajouté en brassant le mélange. Quand le sel est dissous, toujours avec brassage, l'extrait de viande est ajouté. On maintient la préparation à une température proche de l'ébullition mais sans atteindre celle-ci.

Même opération avec la peptone. Après refroidissement, le pH est ajusté aux environ de 7 - 7,2. Précipitation à l'autoclave à 110°-115°, pendant vingt minutes. Le précipité est important. Filtration sur un grand filtre à plis. Répartition en tubes ou en ballons. Bouchage au coton cardé. Stérilisation à l'autoclave pendant trente minutes à 120°. Après refroidissement, les tubes sont fermés par un capuchon de caoutchouc.

— *Gélose nutritive inclinée* : Elle a été préparée, au laboratoire, suivant la technique décrite ci-dessous :

Produits nécessaires :

Bouillon nutritif ordinaire	1 litre.
Agar-agar (Institut PASTEUR)	33 g.

Technique :

L'agar-agar est ajoutée au bouillon (préparé comme ci-dessus) et amené au voisinage de l'ébullition. Après dissolution complète, précipitation à l'autoclave à 110°-115°. Filtration à chaud sur filtre CHARDIN. Répartition en tubes (éventuellement en boîtes de ROUX). Bouchage des tubes au coton cardé puis stérilisation à l'autoclave trente minutes à 120°. Après refroidissement en position

inclinée, les tubes sont obturés par un capuchon de caoutchouc stérile. Conservation des tubes à + 4°.

b) — *Milieux d'identification :*

- *Gélatine* à 150 g par litre préparée par LABPASTEUR.
- *Eau peptonée* à 20 g par litre préparée par LABPASTEUR.
- *Gélose de DRIGALSKI*, préparée par LABPASTEUR (les bactéries faisant fermenter le lactose donnent des colonies jaunes ; les autres, des colonies verdâtres).
- *Gélose éosine-bleu de méthylène*, préparée par LABPASTEUR. (Les *Proteus* donnent de petites colonies grises, ainsi que les *Salmonella*).
- *Milieu S. S.*, préparé par LABPASTEUR. (Les germes lactose positif donnent des colonies rouges, les autres des colonies incolores et transparentes).
- *Milieu de SIMMONS*, au citrate de sodium préparé par LABPASTEUR. (Seuls, les germes capables d'utiliser le citrate de sodium comme unique source de carbone se développent sur ce milieu. Un grand nombre d'entre eux, en provoquant une alcalinisation du milieu, entraîne un virage du vert au bleu).

c) — *Milieux pour l'étude des caractères biochimiques :*

— *Fermentation des glucides :*

Produits nécessaires :

Eau peptonée au rouge de phénol, préparée par LABPASTEUR.

Solutions de glucides, préparées par LABPASTEUR.

Glucose	30 %
Saccharose	30 %
Maltose	30 %
Lactose	25 %
Mannite	20 %
Amidon	10 %

Technique :

Les solutions de glucides sont ajoutées à l'eau peptonée et au rouge de phénol de façon à obtenir une concentration finale de 1 %.

— *Recherche de l'indole :*

Produits nécessaires :

Milieu urée-indole, préparé par LABPASTEUR.

Réactif de KOVACS, préparé par LABPASTEUR.

Technique :

Le contenu d'une ampoule de milieu urée-indole est transvasé dans trois tubes à hémolyse stériles. L'un d'eux servira à la recherche de l'indole. Ce tube est ensemencé avec une culture de vingt-quatre heures à 37° sur gélose et déposé dans une étuve à 37°. Après vingt-quatre heures, on ajoute V à VI gouttes de réactif de KOVACS.

Dans le cas d'une réaction positive, une coloration rouge intense prend place à la partie supérieure du liquide.

— *Recherche de l'uréase :**Produits nécessaires :*

Milieu urée-indole, préparé par LABPASTEUR.

Technique :

Ensemencement du deuxième tube à hémolyse contenant le milieu urée-indole.

Si le germe produit de l'uréase, le tube de culture devient alcalin par formation de carbonate d'ammonium et vire au rouge violacé.

— *Recherche de la tryptophane-désaminase :**Produits nécessaires :*

Milieu urée-indole, préparé par LABPASTEUR.

Perchlorure de fer officinal dilué au 1/3.

Technique :

Le troisième tube à hémolyse qui contient le milieu urée-indole est ensemencé et déposé, pendant deux heures, à l'étuve à 37°. IV gouttes de ce milieu sont prélevées et une goutte de perchlorure de fer est ajoutée.

Dans le cas d'une réaction positive (si le milieu renferme de l'acide indolacétique), il se produit une coloration brun-rouge.

— *Réaction de VOGES PROSKAUER :* Certaines bactéries dégradent le glucose jusqu'au stade de l'acétyl-méthylcarbinol, que l'on caractérise par oxydation.*Produits nécessaires :*

Milieu de CLARK et LUBS, préparé par LABPASTEUR.

α naphthol en solution à 6 % dans de l'alcool à 60°.

Soude caustique à 16 % dans de l'eau distillée.

Technique :

Après deux jours d'incubation à 37° sur milieu de CLARK et LUBS, 1 ml du milieu est prélevé puis additionné de 0,5 ml de solution d' α naphтол et de 1 ml de soude. Agitation, lecture quinze minutes plus tard.

En cas de réaction positive il apparaît, à la surface du milieu, une teinte rouge.

- *Réaction au rouge de méthyle :* Certaines bactéries acidifient fortement le milieu en faisant fermenter le glucose.

Produits nécessaires :

Milieu de CLARK et LUBS, préparé par LABPASTEUR.

Réactif :

Rouge de méthyle	0,10 g
Alcool à 95°	300 ml
Eau distillée	200 ml

Le rouge de méthyle est dissous dans l'alcool et l'eau distillée est ajoutée.

Technique :

Après quatre jours d'incubation à 37°, 2 ml du milieu sont transvasés dans un autre tube. On ajoute alors III gouttes de réactif.

Dans le cas d'une réaction positive, le milieu devient rouge.

Pour le staphylocoque, nous avons utilisé un milieu spécial, le milieu de CHAPMAN. Ce milieu permet de différencier les staphylocoques pathogènes des non pathogènes. Les premiers fermentent le mannitol, les seconds ne le font que très exceptionnellement. Le rouge de phénol sert d'indicateur pour caractériser la dégradation. (Milieu préparé par LABPASTEUR). Nous avons également pratiqué l'épreuve de la coagulase :

Produits nécessaires :

Bouillon spécial pour staphylocoagulase
(LABPASTEUR).

Plasma de lapin (LABPASTEUR).

Technique :

Une colonie isolée est ensemencée sur bouillon spécial. Après dix-huit à vingt-quatre heures d'incubation, 0,5 ml de la culture sont prélevés et déposés dans un tube à hémolyse. On ajoute alors 0,5 ml de plasma. Mélange soigneux. Celui-ci est porté à l'étuve à 37°. Lectures fréquentes,

après trente minutes, une, deux, quatre et vingt-quatre heures.

Un staphylocoque qui provoque la coagulation du plasma de lapin en moins de vingt-quatre heures doit être tenu pour pathogène.

3. — *Mode d'ensemencement* : Les milieux liquides, en tubes, étaient ensemencés avec 0,1 ml d'une suspension de germes normaux ou traités (traitement simple ou double).

Milieux de culture utilisés ainsi :

Bouillon nutritif ordinaire,
Eau peptonée,
Eau peptonée au rouge de phénol + glucides,
Milieu urée-indole,
Milieu de CLARK et LUBS.

Les milieux solides, en tubes, étaient ensemencés stérilement avec une ôhse de platine chargée d'une suspension de germes normaux ou traités (traitement simple ou traitement double). Avec cette ôhse étaient faites des stries à la surface du milieu.

Principaux milieux ensemencés ainsi :

Gélose nutritive inclinée,
Milieu de SIMMONS (au citrate de sodium).

Un milieu a été ensemencé par piqure, il s'agit de la gélatine.

Les milieux solides, coulés en boîtes de PETRI, étaient ensemencés stérilement avec 0,1 ml d'une suspension de germes normaux ou traités (traitement simple ou traitement double). La suspension était déposée sur un bord de la gélose puis étalée à l'aide d'un agitateur de verre recourbé et (naturellement) stérile.

Milieux ainsi ensemencés :

Gélose de DRIGALSKI,
Milieu S. S.,
Gélose éosine-bleu de méthylène.

Après ensemencement, tous les milieux étaient déposés dans une étuve à 37°. La lecture des résultats était faite après vingt-quatre et quarante-huit heures.

B) — Résultats :

Afin d'éviter une énumération fastidieuse, seront seulement rapportés ici les résultats observés au bout de quarante-huit heures et offrant une différence avec ceux communément recueillis. A ce sujet, nous précisons que, pour les germes qui avaient subi un traitement simple les témoins étaient des germes normaux, que, pour les germes qui avaient

subi un traitement double, les témoins étaient d'une part les germes normaux (témoin T), de l'autre les germes qui avaient déjà subi un premier traitement (témoin t).

1. — *Observations faites avec le staphylocoque TIN :*

a) — *Germes normaux :*

— *Caractères de culture :*

Milieux usuels :

Bouillon nutritif ordinaire : Après culture de vingt-quatre heures à 37°, trouble uniforme. Les jours suivants, dépôt des microbes au fond des tubes sans éclaircissement du surnageant.

Gélose nutritive inclinée : culture abondante, brillante.

Milieu d'identification :

Gélatine : liquéfaction progressive à partir du quatrième jour, en forme d'entonnoir.

Eau peptonée : culture identique à celle observée en bouillon, mais moins abondante.

N'ont pas été utilisés, dans le cas du staphylocoque TIN, les milieux suivants :

Gélose de DRIGALSKI,

Gélose éosine-bleu de méthylène.

Milieu S. S.

Ils ont été réservés à l'étude des germes GRAM négatif.

Milieu de SIMMONS (au citrate de sodium) :

Aucune culture.

— *Caractères biochimiques :*

Fermentation des glucides :

Glucose	+
Saccharose	+
Maltose	+
Lactose	+
Mannite	±
Amidon	±

Recherche de l'indole —

Recherche de l'uréase —

Réaction de VOGES PROSKAUER..... —

Réaction au rouge de méthyle..... —

— *Réactions spéciales, particulières aux staphylocoques :*

Culture sur milieu de CHAPMAN : Culture abondante, avec virage du milieu au jaune.

Epreuve de la staphylocoagulase : Réaction positive en une demi-heure.

b) — *Germes traités :*

— *Traitement simple :*

Germes traités par P II : Culture agglutinée en bouillon nutritif ordinaire (T = trouble uniforme). Colonies bien séparées sur gélose inclinée (T = culture en nappe) .

Fermentation plus active de la mannite (+, T = $\pm$), et de l'amidon (+, T = $\pm$).

Allongement du temps de l'épreuve de la staphylocoagulase (1 heure, T = 1/2 heure).

Germes traités par le chlorure de calcium : Allongement du temps de l'épreuve de la staphylocoagulase (1 heure, T = 1/2 heure).

Germes traités par la trypsine : Fermentation moins active du saccharose ($\pm$, T = +) et du lactose (—, T = +). Allongement du temps de l'épreuve de la staphylocoagulase (1 heures, T = 1/2 heure).

Germes traités par le lysozyme : Fermentation plus active de l'amidon (+, T = $\pm$).

— *Traitement double :*

Germes traités d'abord par le P II :

Un traitement secondaire par le chlorure de calcium, a donné une culture non agglutinée en bouillon nutritif ordinaire (T = culture non agglutinée, t = culture agglutinée).

Un traitement secondaire par la trypsine a fourni une culture en nappe sur gélose inclinée (T = culture en nappe, t = colonies bien séparées).

Fermentation nulle du lactose (T = +, t = +).

Un traitement secondaire des germes par le lysozyme a raccourci le temps de l'épreuve de la staphylocoagulase (moins de 1/2 heure, T = 1/2 heure, t = 1 heure).

Germes traités d'abord par le chlorure de calcium :

Un traitement secondaire par le P II a conduit à l'obtention en culture, de colonies bien séparées

sur gélose inclinée (T = culture en nappe, t = culture en nappe), il a entraîné une fermentation plus active de la mannite et de l'amidon (+, T = $\pm$, t = $\pm$), il a donné une culture positive sur milieu de CHAPMAN, mais sans virage de coloration (T = culture avec virage du milieu, t = culture avec virage du milieu).

Un traitement secondaire par le chlorure de calcium a prolongé le temps de l'épreuve de la staphylocoagulase (plus de 1 heure 1/2, T = 1/2 heure, t = 1 heure), il a donné une culture positive sur milieu de CHAPMAN mais sans virage de coloration (T = culture avec virage, t = culture avec virage).

Un traitement secondaire par le lysozyme a entraîné une fermentation plus importante de la mannite et de l'amidon (+, T = $\pm$, t = $\pm$).

Germes traités d'abord par la trypsine :

Un traitement secondaire par le P II a donné une fermentation plus active de la mannite et de l'amidon (+, T = $\pm$, t = $\pm$).

Un traitement secondaire par le chlorure de calcium a entraîné une fermentation plus importante de la mannite et de l'amidon (+, T = $\pm$, t = $\pm$).

Un traitement secondaire par la trypsine a produit une fermentation plus importante de la mannite et de l'amidon (+, T = $\pm$, t = $\pm$).

Un traitement secondaire par le lysozyme a entraîné une fermentation plus active de la mannite et de l'amidon (+, T = $\pm$, t = $\pm$), et il a diminué le temps d'épreuve de la staphylocoagulase (45 minutes, T = 1/2 heure, t = 1 heure).

Germes traités d'abord par le lysozyme :

Un traitement secondaire par le P II, enfin, a donné des colonies bien séparées sur gélose inclinée (T = culture en nappe, t = culture en nappe) et une fermentation plus importante de la mannite (+, T = $\pm$, t = $\pm$).

2. — *Observations faites avec la Salmonella typhimurium :*a) — *Germes normaux :*— *Caractères de culture :**Milieux usuels :*

Bouillon nutritif ordinaire : Milieu uniformément trouble.

Gélose nutritive inclinée : Culture abondante, d'aspect crémeux, un peu irrisée.

Milieux d'identification :

Gélatine : Pas de liquéfaction.

Eau peptonée : Culture identique à celle observée en bouillon, mais moins abondante.

Gélose de DRIGALSKI : Colonies bleuâtres.

Gélose éosine-bleu de méthylène : Petites colonies incolores.

Milieu S. S. : Colonies incolores.

Milieu de SIMMONS (au citrate de sodium) :

Culture positive, avec virage de coloration du milieu en quatre jours.

— *Caractères biochimiques :**Fermentation des glucides :*

Glucose +

Saccharose —

Maltose +

Lactose —

Mannite +

Amidon +

Recherche de l'indole —

Recherche de l'uréase —

Réaction de VOGES PROSKAUER..... —

Réaction au rouge de méthyle..... +

Recherche de la tryptophane-désaminase..... —

b) — *Germes traités :*— *Traitement simple :*

Germes traités par PzII : Culture légèrement agglutinée en bouillon nutritif ordinaire (T = trouble uniforme), culture positive avec virage de coloration du milieu en moins de trois jours sur milieu de SIMMONS (T = culture positive avec virage du milieu en quatre jours), fermentation du lactose ($\pm$, T = —).

Germes traités par le lysozyme : Fermentation du lactose ($\pm$, T = ---).

— *Traitement double* :

Germes traités d'abord par le P II :

Un traitement secondaire par le lysozyme a conduit à l'obtention de culture entraînant en quarante-huit heures un virage de coloration du milieu de SIMMONS (T = culture positive avec virage du milieu en quatre jours, t = culture positive avec virage du milieu en moins de trois jours), et provoquant la fermentation du saccharose ($\pm$, T = --- , t = ---).

Germes traités d'abord par le chlorure de calcium :

Un traitement secondaire par le lysozyme a fait apparaître une fermentation du saccharose ($\pm$, T = --- , t = ---).

Germes traités d'abord par la trypsine :

Un traitement secondaire par le P II, le chlorure de calcium, la trypsine ou le lysozyme a fourni des cultures provoquant en vingt-quatre heures un virage de coloration du milieu de SIMMONS (T = culture positive avec virage en quatre jours, t = culture positive avec virage en quatre jours).

Germes traités d'abord par le lysozyme :

Un traitement secondaire par le P II ou le lysozyme a donné, sur milieu de SIMMONS, une culture avec virage du milieu en vingt-quatre heures (T et t = cultures positives avec virage en quatre jours).

Un traitement secondaire par le chlorure de calcium a fourni, en vingt-quatre heures, une culture sur milieu de SIMMONS, sans virage du milieu (T et t = cultures positives avec virage en quatre jours).

Un traitement secondaire par la trypsine a donné sur milieu de SIMMONS, une culture en vingt-quatre heures sans virage du milieu (T et t = cultures positives avec virage du milieu en quatre jours), il a supprimé la fermentation du lactose (--- , T = --- , t = $\pm$).

3. — *Observations faites avec le Proteus morganii :*a) — *Germes normaux :*— *Caractères de culture :**Milieux usuels :*

Bouillon nutritif ordinaire : Trouble uniforme, pas de voile ni de collerette en surface. Odeur putride.
Gélose nutritive inclinée : Culture abondante en nappe.

Milieux d'identification :

Gélatine : Pas de liquéfaction.
Eau peptonée : Trouble avec dépôt au fond des tubes.
Gélose de DRIGALSKI : Colonies grises.
Gélose éosine-bleu de méthylène : Colonies roses ne présentant pas de reflet métallique.
Milieu S. S. : Colonies grises.
Milieu de SIMMONS : Aucune culture.

— *Caractères biochimiques :**Fermentation des glucides :*

Glucose	+
Saccharose	—
Maltose	—
Lactose	+
Mannite	±
Amidon	+
Recherche de l'indole	+
Recherche de l'uréase	+
(en deux heures)	
Réaction de VOGES PROSKAUER.....	—
Réaction au rouge de méthyle.....	+
Recherche de la tryptophane-désaminase	+

b) — *Germes traités :*— *Traitement simple :*

Germes traités par P II : Obtention d'une culture, avec virage de coloration du milieu en quatre jours, sur milieu de SIMMONS (T = pas de culture), apparition de la fermentation du maltose ($\pm$, T = —), fermentation plus marquée de la mannite (+, T = $\pm$).

Germes traités par le chlorure de calcium : Ils ont acquis le pouvoir de faire fermenter le saccharose

et le maltose ($\pm$, $T = -$) ; en revanche, ils ont perdu le pouvoir de faire fermenter le lactose ($-$, $T = +$).

Germes traités par la trypsine ou le lysozyme : Font fermenter le maltose ($+$, $T = -$).

— *Traitement double* :

Germes traités d'abord par le P II :

Après traitement secondaire par P II, fermentation par les germes du saccharose ($\pm$, $T = -$, $t = -$).
Après traitement secondaire par le lysozyme, obtention d'une culture positive avec virage du milieu en vingt-quatre heures sur milieu de SIMMONS ($T =$ pas de culture, $t =$ culture positive avec virage en quatre jours).

Germes traités d'abord par le chlorure de calcium :

Un traitement secondaire par le P II, la trypsine ou le lysozyme a conduit à l'obtention de cultures avec virage de la coloration en six jours, sur milieu de SIMMONS (T et $t =$ pas de culture) ; nous avons vu aussi réapparaître la fermentation du lactose ($\pm$, $T = +$, $t = -$).

Germes traités d'abord par la trypsine :

Après traitement secondaire par le P II, fermentation moins marquée du lactose ($\pm$, T et $t = +$).

Après traitement secondaire par le lysozyme : Apparition sur milieu de SIMMONS d'une culture positive avec virage de la coloration en cinq jours (T et $t =$ aucune culture).

Germes traités d'abord par le lysozyme :

Après traitement secondaire par P II, fermentation positive du saccharose ($+$, T et $t = -$), fermentation du maltose moins marquée que normalement ($\pm$, $T = -$, $t = +$).

Après traitement secondaire par le chlorure de calcium, fermentation moins marquée que normalement du maltose ($\pm$, $T = -$, $t = +$).

Après traitement secondaire par le lysozyme, fermentation positive du saccharose ($+$, T et $t = -$).

DISCUSSION

Nous rappellerons une fois encore, avant de résumer les plus importants de nos résultats, que les germes traités (traitement simple ou double) étaient lavés à plusieurs reprises avant d'être ensemencés sur les différents milieux de culture.

Dans ces conditions, bien précises, nous avons pu observer les principaux faits que voici :

1. — Les traitements, simples ou doubles, appliqués aux germes ne les ont tués en aucun cas. Après ensemencement, nous avons toujours obtenu une culture positive. Cependant, les germes qui se multipliaient ne se comportaient pas toujours, sur milieux d'identification, comme des germes normaux. Ils pouvaient aussi avoir des propriétés biochimiques particulières.
2. — *En ce qui concerne les modifications observées sur milieux d'identification*, nous citerons, comme exemples, les plus importantes, les suivantes :

- a) — *La culture sur milieu de SIMMONS*, qui est normalement négative avec le *Proteus morganii*, devient positive, avec virage du milieu, en vingt-quatre heures à six jours, quand le germe ensemencé a subi, soit un traitement simple par le polypeptide P II (elle est alors positive en quatre jours), soit un traitement double.

Exemples : Après action du P II puis du lysozyme, culture positive en vingt-quatre heures ; après action de la trypsine puis du lysozyme, culture positive en cinq jours ; après action du chlorure de calcium puis du P II, culture positive en six jours.

- b) — De même, le délai d'apparition d'une culture pour *Salmonella typhimurium*, qui normalement est, sur ce milieu, de quatre jours, se trouve diminué quand le germe a subi un traitement simple par le polypeptide P II (la culture devient positive en moins de trois jours) ou un traitement double.

Exemples : Action de la trypsine puis du P II (culture positive en vingt-quatre heures), action du P II puis du lysozyme (culture positive en quarante-huit heures).

- c) — *Quant à la culture sur milieu de CHAPMAN*, qui est normalement positive avec virage du milieu,

après ensemencement du staphylocoque TIN, elle reste positive, mais sans virage, lorsque ce germe a subi un traitement double.

Exemples : Par le chlorure de calcium puis par P II, ou par le chlorure de calcium puis par le chlorure de calcium.

3. — En ce qui concerne les *différentes propriétés biochimiques* qui, elles-mêmes, peuvent être perturbées, il convient d'insister surtout sur la fermentation des glucides et l'épreuve de la staphylocoagulase.

- a) — *La fermentation des glucides*, dans nos expériences, a été tantôt diminuée, tantôt augmentée. Parfois même, un sucre qui n'est pas normalement fermenté l'est devenu par un germe d'abord traité.

Exemples : Le staphylocoque TIN soumis à un traitement simple par la trypsine fait fermenter le saccharose et le lactose d'une façon inférieure à la normale.

La Salmonella typhimurium soumise à un double traitement, d'abord par le lysozyme puis par la trypsine, ne fait plus fermenter le lactose.

Même observation pour le *Proteus morganii*, après traitement simple par le chlorure de calcium.

En revanche, le staphylocoque TIN, après traitement simple par le polypeptide P II, ou après un double traitement (chlorure de calcium puis P II, chlorure de calcium puis lysozyme, trypsine puis P II ou chlorure de calcium ou trypsine ou lysozyme) fait fermenter la mannite et l'amidon d'une façon supérieure à la normale. De même, la *Salmonella typhimurium*, après traitement simple par le P II ou le lysozyme, fait mieux fermenter le lactose. Après double traitement, P II puis lysozyme, elle fait mieux fermenter le saccharose.

Après traitement simple par P II, le *Proteus morganii*, lui, fait mieux fermenter la mannite.

Enfin, pour ce qui est de l'apparition d'une fermentation qui n'existe pas quand sont en cause des germes normaux, nous donnerons les exemples suivants :

Fermentation positive du lactose par la *Salmonella typhimurium* après traitement de ce germe par le P II ou le lysozyme. Fermentation positive du saccharose par le même germe traité d'abord par le P II puis par le lysozyme.

Fermentation positive enfin du maltose et du saccharose par le *Proteus morganii* après traitement de ce germe par le chlorure de calcium.

- b) — *Le temps de l'épreuve de la staphylocoagulase* a été augmenté quand les staphylocoques utilisés avaient d'abord été traités (traitement simple) par le P II, le chlorure de calcium ou la trypsine. Le même temps, en revanche, était diminué après double traitement des germes par P II puis par le lysozyme.
4. — Comment expliquer la production des diverses modifications observées ? Comment ont pu agir, isolément ou l'une après l'autre, les substances que nous avons utilisées pour cette production ? Là encore, nous essaierons de fournir une réponse dans un chapitre à part : le chapitre VII de cette seconde partie.
5. — Les modifications en cause sont-elles durables ? Non. Elles ne sont que transitoires. Après un ou deux repiquages sur gélose nutritive, les descendants des germes traités ont toutes les caractéristiques de germes normaux.

CONCLUSIONS

1. — Dans les conditions d'expériences réalisées, le traitement (simple ou double) des germes n'a pas empêché, ultérieurement, leur culture sur les milieux que nous avons retenus.
2. — Les germes, toutefois, qui se multipliaient pouvaient être différents des germes normaux, soit par leur comportement sur milieux d'identification, soit par la perte ou l'acquisition de certains caractères biochimiques.
3. — Mais, dans tous les cas, les changements observés n'ont été que transitoires. Lors de subcultures, les germes obtenus, bien que descendant des germes traités, étaient en tous points comparables à des germes normaux.
-

DEUXIÈME PARTIE

CHAPITRE IV

LES MODIFICATIONS DU MÉTABOLISME RESPIRATOIRE

INTRODUCTION

Dans les chapitres précédents, nous avons montré que certains germes (staphylocoque TIN, *Salmonella typhimurium*, *Proteus morganii*), quand ils ont été traités par différentes substances : complexe polypeptidique P II, chlorure de calcium, trypsine, lysozyme, appliquées isolément ou appliquées sur un même germe l'une après l'autre, peuvent demeurer, du moins dans leur majorité, vivants (cf : chapitre III), mais qu'ils sont devenus différents de ce qu'ils étaient avant tout traitement.

1. — Leur agglutinabilité par le complexe polypeptidique P II a subi de profondes modifications (chapitre I) ;
2. — Leur morphologie est très souvent altérée (chapitre II) ;
3. — Leurs caractères de culture et leurs caractères biochimiques peuvent également avoir changé (chapitre III).

Ceci acquis, il nous a paru intéressant de rechercher ce que devenait, au même moment, leur *métabolisme respiratoire*. Était-il, lui aussi, modifié ? Et, si cela était, dans quel sens ?

PARTIE EXPÉRIMENTALE

A) — Techniques :

1. — *Préparation des germes* : Nous avons utilisé les trois germes habituels : staphylocoque TIN, *Salmonella typhimurium*, *Proteus morganii*.

a) — *Utilisation de germes normaux* : Les suspensions de germes préparées après culture sur gélose étaient lavées plusieurs fois par de l'eau physiologique. Après centrifugation, le dernier culot était remis en suspension dans une quantité d'eau physiologique suffisante pour que la concentration en germes dans le milieu soit de 200×10^7 par ml.

b) — *Utilisation des germes traités* :

— *Traitement simple* : Les germes en suspension étaient mis en contact avec les substances dont nous poursuivions l'étude (P II, chlorure de calcium, trypsine, lysozyme) (concentration finale dans le milieu, P II, trypsine, lysozyme : 1 mg par ml ; chlorure de calcium : M/2), dans un bain-marie agité à 37° , pendant une heure. Les germes étaient ensuite recueillis, lavés, et le dernier culot était remis en suspension dans une quantité d'eau physiologique suffisante pour fournir une concentration finale de 200×10^7 germes par ml.

— *Traitement double* : Un traitement simple était d'abord appliqué. Puis, après lavages, les germes étaient de nouveau mis en contact avec l'une ou l'autre des substances étudiées. Ils étaient ensuite lavés et remis en suspension dans de l'eau physiologique de façon à obtenir 200×10^7 germes par ml. (Des renseignements complémentaires concernant le mode d'application de ces deux traitements ont été fournis dans la première partie de ce travail).

2. — *Technique manométrique de WARBURG* : (119)

a) — *Description de l'appareil* : L'appareil de WARBURG consiste essentiellement en un bain-marie à température constante dans lequel sont agitées des fioles reliées à un manomètre dont une des branches est ouverte.

— *Le bain-marie* : Dans nos conditions d'expérience, le bain-marie a été réglé à 37° .

- *Les fioles* : De contenance connue, les fioles comprennent une dérivation latérale qui peut être obturée par un bouchon ou reliée à une arrivée de gaz et une petite cupule centrale dans laquelle est déposée la potasse qui absorbera le CO_2 dans le cas d'une mesure de la consommation d'oxygène.
- *Les manomètres* : Egalement de contenance connue, comprennent deux branches graduées dont l'une est ouverte et l'autre reliée à la fiole par un robinet à trois voies et un réservoir de liquide dont on ajuste le niveau au moyen d'une vis. Le liquide, de densité connue, est celui de BRODIE (Chlorure de calcium : 25 g, Choléate de sodium : 5 g, eau distillée q.s.p. 500 ml, coloré par quelques gouttes de bleu de méthylène).

b) — *Principe de la méthode* : Détermination de la quantité d'oxygène consommé par une suspension bactérienne de titre connu.

Les mesures ne peuvent être faites avec rigueur que si la pression atmosphérique et la température du bain-marie ne varient pas pendant la durée de l'expérience. Pour se rendre compte des variations possibles et les corriger, on utilise un ou plusieurs thermobaromètres (généralement deux). Un thermobaromètre est constitué par une fiole contenant un volume d'eau physiologique glucosée égal au volume total des liquides contenus dans les fioles en expérience. A chaque lecture faite sur les manomètres appartenant aux fioles en réaction, on lit le niveau du liquide dans la branche ouverte du thermobaromètre. Si le niveau monte, dans la branche du manomètre, c'est le fait d'une diminution de pression ou d'une élévation de température du bain-marie.

c) — *Description de la méthode que nous avons suivie* :

Dans les fioles *thermobaromètres* ont été déposés :

3 ml d'eau physiologique glucosée à 0,02 M.

Dans les fioles *témoins* ont été déposés :

2 ml d'eau physiologique glucosée à 0,02 M.

1 ml d'une suspension de germes normaux.

Dans les fioles en *expérience* ont été déposés :

2 ml d'eau physiologique glucosée à 0,02 M.

1 ml d'une suspension de germes traités (traitement simple ou double).

Pratiquement, les fioles étaient préparées en double et dans chacune 0,2 ml de potasse à 20 % étaient introduits dans la cupule centrale. Toutes les fioles étaient montées sur les manomètres correspondants et ceux-ci étaient agités (90 oscillations par minute), robinets ouverts, dans le bain-marie de l'appareil, pendant dix minutes environ (pour réaliser l'équilibre des températures). Le niveau du liquide de BRODIE contenu dans les manomètres était alors soigneusement ajusté à la graduation 150, et les robinets étaient fermés. L'heure était notée. L'expérience se poursuivait généralement pendant quatre ou cinq heures, avec une lecture toutes les trente minutes.

- d) — *Calcul des résultats* : Les résultats sont exprimés en μ l d'oxygène consommé par heure et calculés suivant la formule :

$$X = h K$$

où h = hauteur lue dans le manomètre, compte tenu de la correction de pression (thermobaromètre) et ramenée à une heure.

$$(Vg \times 273 + Vf \alpha)$$

$$K = \frac{T}{Po}$$

où Vg = Volume total moins volume des liquides.

T = Température du bain en degrés absolus (soit 273 plus la température en degrés centigrades).

Vf = Volume des liquides.

α = Solubilité dans le liquide de la fiole du gaz de l'atmosphère (exprimée en ml de liquide, quand le gaz est à une pression de 760 mm Hg à la température T) (donnée par les tables).

Po = Pression standard par rapport au liquide manométrique (densité Hg / densité du liquide manométrique).

B) — Résultats :

Les chiffres qui sont rapportés dans les tableaux suivants, sont les chiffres moyens obtenus après cinq expériences poursuivies chacune pendant quatre heures. Ils expriment la quantité d'oxygène en μ l consommé par heure par 10^9 bactéries.

1. — Observations faites avec le staphylocoque *TIN* :

a) — Germes soumis à un traitement simple :

TABLEAU N° 24

Nature de la substance ayant servi au traitement des germes	Quantité de O ₂ consommé par heure et par 10 ⁹ germes, et exprimée en μ l.
P II	3 à 5 μ l
Chlorure de calcium	16 à 18 μ l
Trypsine	24 à 25 μ l
Lysozyme	18 à 19 μ l
Eau physiologique (témoin)	16 à 17 μ l

b) — *Staphylocoques TIN* soumis à un traitement double :

TABLEAU N° 25

Nature de la substance ayant servi au premier traitement Nature de la substance ayant servi au traitement secondaire des germes	P II	Chlorure de calcium	Trypsine	Lysozyme
P II	1 à 2 μ l	2 à 3 μ l	12 à 13 μ l	12 à 13 μ l
Chlorure de calcium	6 à 7 μ l	2 à 3 μ l	1 à 2 μ l	18 à 19 μ l
Trypsine	8 à 9 μ l	13 à 15 μ l	37 à 38 μ l	18 à 19 μ l
Lysozyme	1 à 2 μ l	11 à 12 μ l	12 à 13 μ l	19 à 20 μ l
Eau physiologique (témoin <i>t</i>), germes après le traitement primaire	4 à 5 μ l	15 à 17 μ l	21 à 22 μ l	18 à 19 μ l
Rappel du témoin (<i>T</i>), germes avant tout traitement	16 à 17 μ l			

2. — *Observations faites avec la Salmonella typhimurium :*a) — *Germes soumis à un traitement simple :*

TABLEAU N° 26

Nature de la substance ayant servi au traitement des germes	Quantité de O ₂ consommé par heure et par 10 ⁹ germes, et exprimée en μ l.
P II	1 à 2 μ l
Chlorure de calcium	15 à 17 μ l
Trypsine	22 à 23 μ l
Lysozyme	16 à 17 μ l
Eau physiologique (témoin)	15 à 17 μ l

b) — *Germes soumis à un double traitement :*

TABLEAU N° 27

Nature de la substance ayant servi au premier traitement Nature de la substance ayant servi au traitement secondaire des germes	P II	Chlorure de calcium	Trypsine	Lysozyme
P II	1 à 2 μ l	4 à 5 μ l	12 à 13 μ l	7 à 8 μ l
Chlorure de calcium	6 à 7 μ l	7 à 8 μ l	10 à 11 μ l	16 à 17 μ l
Trypsine	31 à 32 μ l	15 à 16 μ l	43 à 44 μ l	15 à 16 μ l
Lysozyme	1 à 2 μ l	7 à 8 μ l	12 à 13 μ l	17 à 18 μ l
Eau physiologique (témoin <i>t</i>), germes après le traitement primaire	3 à 4 μ l	15 à 17 μ l	22 à 23 μ l	16 à 17 μ l
Rappel du témoin (<i>T</i>), germes avant tout traitement	16 à 17 μ l			

3. — Observations faites avec le *Proteus morganii* :

a) — Germes soumis à un traitement simple :

TABLEAU N° 28

Nature de la substance ayant servi au traitement des germes	Quantité de O ₂ consommé par heure et par 10 ⁹ germes, et exprimée en μ l.
P II	6 à 7 μ l
Chlorure de calcium	12 à 13 μ l
Trypsine	10 à 11 μ l
Lysozyme	7 à 8 μ l
Eau physiologique (témoin)	7 à 8 μ l

b) — Germes soumis à un double traitement :

TABLEAU N° 29

Nature de la substance ayant servi au premier traitement Nature de la substance ayant servi au traitement secondaire des germes	P II	Chlorure de calcium	Trypsine	Lysozyme
P II	4 à 5 μ l	5 à 6 μ l	6 à 7 μ l	4 à 5 μ l
Chlorure de calcium	6 à 7 μ l	12 à 13 μ l	10 à 11 μ l	5 à 6 μ l
Trypsine	16 à 17 μ l	12 à 13 μ l	12 à 13 μ l	6 à 7 μ l
Lysozyme	5 à 6 μ l	7 à 8 μ l	6 à 7 μ l	9 à 10 μ l
Eau physiologique (témoin <i>t</i>), germes après le traitement primaire	6 à 7 μ l	12 à 13 μ l	11 à 12 μ l	7 à 8 μ l
Rappel du témoin (<i>T</i>), germes avant tout traitement	6 à 7 μ			

La lecture des tableaux précédents apporte les renseignements que voici :

1. — *Après traitement simple des germes :*

- a) — *Le traitement par P II* diminue fortement le métabolisme respiratoire du staphylocoque TIN et de *Salmonella typhimurium*. Il reste, en revanche, sans action sur celui de *Proteus morganii*.
- b) — *Le traitement par le chlorure de calcium* reste sans effet sur le métabolisme respiratoire du staphylocoque TIN et de *Salmonella typhimurium*. Il multiplie pratiquement par deux celui de *Proteus morganii*.
- c) — *Le traitement par la trypsine* augmente, de façon notable, le métabolisme respiratoire du staphylocoque TIN et de *Salmonella typhimurium* et, très légèrement, celui de *Proteus morganii*.
- d) — *Le traitement par le lysozyme* est resté sans effet sur le métabolisme respiratoire des trois germes.

2. — *Après traitement double des germes :*

- a) — *Germes traités d'abord par P II :*
 - *Le traitement secondaire par P II* a diminué le métabolisme respiratoire des trois germes par rapport à T et à t.
 - *Le traitement secondaire par le chlorure de calcium* a, par rapport à t, augmenté légèrement le métabolisme respiratoire du staphylocoque TIN et de *Salmonella typhimurium*. Par rapport à T le métabolisme respiratoire de ces deux germes est resté au-dessous de la normale. Il n'a pas eu d'action sur le métabolisme respiratoire de *Proteus morganii* par rapport à T et à t.
 - *Le traitement secondaire par la trypsine* a augmenté, par rapport à T et à t, le métabolisme respiratoire de *Salmonella typhimurium* et de *Proteus morganii*. Il a augmenté celui des staphylocoques TIN par rapport à t, néanmoins ce métabolisme reste encore au-dessous de la normale par rapport à T.
 - *Le traitement secondaire par le lysozyme* a diminué légèrement, par rapport à T et à t, le métabolisme respiratoire du staphylocoque TIN et de *Salmonella typhimurium*. Il est resté sans effet sur celui de *Proteus morganii* (par rapport à T et à t).

b) — *Germe traité d'abord par le chlorure de calcium :*

- *Le traitement secondaire par P II a*, par rapport à T et à t, inhibé pratiquement le métabolisme respiratoire du staphylocoque TIN, il a diminué de façon très notable celui de *Salmonella typhimurium* et de *Proteus morganii*.
- *Le traitement secondaire par le chlorure de calcium* a inhibé presque entièrement le métabolisme respiratoire du staphylocoque TIN, il a diminué de moitié environ celui de *Salmonella typhimurium*, par rapport à T et à t. Il est resté sans action sur celui de *Proteus morganii* par rapport à t, mais le métabolisme respiratoire de ce germe reste encore au-dessus de la normale par rapport à T.
- *Le traitement secondaire par la trypsine* n'a eu pratiquement aucune action sur le métabolisme respiratoire du staphylocoque TIN et de la *Salmonella typhimurium* par rapport à T et à t, et de *Proteus morganii* par rapport à t. Cependant le métabolisme respiratoire de ce germe reste encore au-dessus de la normale par rapport à T.
- *Le traitement secondaire par le lysozyme* a diminué légèrement le métabolisme respiratoire du staphylocoque TIN et, de façon notable, celui de *Salmonella typhimurium* par rapport à T et à t. Le métabolisme respiratoire du *Proteus morganii* a été diminué par rapport à t, il est redevenu égal au témoin T.

c) — *Germe traité d'abord par la trypsine :*

- *Le traitement secondaire par le P II* a diminué le métabolisme respiratoire des trois germes par rapport à T et à t.
- *Le traitement secondaire par le chlorure de calcium* a inhibé le métabolisme respiratoire du staphylocoque TIN, et il a diminué celui de *Salmonella typhimurium* par rapport à T et à t. Il est resté sans effet, par rapport à t, sur *Proteus morganii*, toutefois le métabolisme respiratoire de ce germe reste au-dessus de la normale par rapport à T.
- *Le traitement secondaire par la trypsine* a augmenté considérablement le métabolisme respiratoire du staphylocoque TIN et de *Salmonella typhimurium* par rapport à T et à t. Il est resté pratiquement sans effet sur celui de *Proteus morganii* par rapport à t.

Toutefois, par rapport à T, le métabolisme respiratoire de ce germe est demeuré au-dessus de la normale.

- *Le traitement secondaire par le lysozyme* a diminué de moitié environ le métabolisme respiratoire des trois germes, par rapport à t, et, très légèrement, ces mêmes métabolismes, par rapport à T.

d) — *Germes traités d'abord par le lysozyme :*

- *Le traitement secondaire par P II* a diminué légèrement le métabolisme respiratoire du staphylocoque TIN, il a diminué de moitié environ celui de *Salmonella typhimurium* et de *Proteus morganii*, par rapport à T et à t.
- *Le traitement secondaire par le chlorure de calcium*, par rapport à T et à t, n'a eu aucune action sur le métabolisme respiratoire du staphylocoque TIN et de *Salmonella typhimurium* ; il a diminué très légèrement celui du *Proteus morganii*.
- *Le traitement secondaire par la trypsine ou le lysozyme* n'a eu aucune action sur le métabolisme des trois germes par rapport à T et à t.

DISCUSSION

Dans un premier temps, nous donnerons un résumé des principaux faits observés. Dans un second temps, nous rapporterons, en les commentant, les quelques résultats obtenus, dans le même domaine, par d'autres auteurs.

1. — *Résumé des principaux faits observés :* Nous rappellerons tout d'abord que les résultats sont exprimés en μl d'oxygène consommé en une heure par 10^9 germes.

— *Après traitement simple* des germes, nous avons pu remarquer les faits suivants :

- a) — Une fois encore, le polypeptide P II a laissé indifférent le *Proteus morganii* (μl d'oxygène consommé par les germes témoins : 7 à 8, par les germes traités : 6 à 7). Par contre il a diminué fortement le métabolisme respiratoire des staphylocoques TIN (germes témoins : 16 à 17 μl , germes traités : 3 à 5 μl), et des *Salmonella typhimurium* (germes témoins : 15 à 17 μl , germes traités : 1 à 2 μl).

- b) — Le chlorure de calcium, tout en étant sans action sur le métabolisme respiratoire des staphylocoques TIN (germes témoins : 16 à 17 μ l, germes traités : 16 à 18 μ l), et des *Salmonella typhimurium* (germes témoins : 15 à 17 μ l, germes traités : 16 à 17 μ l) a doublé pratiquement celui des *Proteus morganii* (germes témoins : 7 à 8 μ l, germes traités : 12 à 13 μ l).
- c) — La trypsine a augmenté le métabolisme respiratoire des trois germes, légèrement pour les *Proteus morganii* (germes témoins : 7 à 8 μ l, germes traités : 10 à 11 μ l), de façon notable pour les staphylocoques TIN (germes témoins : 16 à 17 μ l, germes traités : 24 à 25 μ l) et les *Salmonella typhimurium* (germes témoins : 15 à 17 μ l, germes traités : 21 à 22 μ l).
- d) — Le lysozyme n'a eu aucune action sur les trois germes.

— Après traitement double des germes, nous avons pu observer les faits suivants :

- a) — Le polypeptide P II, utilisé pour le second temps d'un double traitement, a diminué le métabolisme respiratoire des trois germes, quelle que soit la nature de la substance qui avait servi au premier traitement.

Exemples :

Staphylocoques TIN :

Témoin T	16 à 17 μ l
Témoin t	15 à 17 μ l
Traités par le chlorure de calcium puis par P II	2 à 3 μ l

Salmonella typhimurium :

Témoin T	15 à 17 μ l
Témoin t	16 à 17 μ l
Traités par la trypsine puis par P II...	10 à 11 μ l

Proteus morganii :

Témoin T	7 à 8 μ l
Témoin t	7 à 8 μ l
Traités par le lysozyme puis par P II.	4 à 5 μ l

- b) — Le chlorure de calcium, utilisé pour le premier temps d'un double traitement des trois germes, a inhibé l'action de la trypsine appliquée secondairement.

Exemple :

Staphylocoques TIN :

Témoin T	16 à 17 μ l
Témoin t	15 à 17 μ l
Traités par le chlorure de calcium puis par la trypsine	13 à 15 μ l
(Rappelons : staphylocoques TIN traités par la tryp- sine, 24 à 25 μ l).	

- c) — Le lysozyme, utilisé pour le premier temps d'un double traitement a inhibé l'action secondaire de la trypsine pour les trois germes.

*Exemple :**Salmonella typhimurium :*

Témoin T	15 à 17 μ l
Témoin t	16 à 17 μ l
Traitées par le lysozyme puis par la trypsine	15 à 16 μ l
(Rappelons : <i>Salmonella typhimurium</i> traitées par la trypsine, 22 à 23 μ l).	

Utilisé pour le second temps d'un double traitement, le lysozyme a neutralisé l'action primaire du chlorure de calcium sur le *Proteus morganii*.

Exemple :

Témoin T	7 à 8 μ l
Témoin t	12 à 13 μ l
Traités par le chlorure de calcium puis par le lysozyme	7 à 8 μ l

Il a neutralisé également l'action primaire de la trypsine sur les trois germes.

*Exemple :**Salmonella typhimurium :*

Témoin T	15 à 17 μ l
Témoin t	22 à 23 μ l
Traités par la trypsine puis par le lysozyme	12 à 13 μ l

2. — Résultats déjà obtenus, dans le même domaine, par différents auteurs.

- a) — Résultats obtenus avec des substances semblables à celles que nous avons personnellement utilisées.

— La trypsine : En 1957, W.E. ENGELHARD et coll. (42), ayant étudié l'action de la trypsine sur le métabolisme

respiratoire du *Mycobactérium tuberculosis* var. *hominis* (H 37 Rv), ont obtenu des résultats semblables aux nôtres ; ils ont observé, eux aussi, une augmentation du métabolisme.

- *Le lysozyme* : M. TETI et G. FALCONE, en 1952 (118), après traitement de *Salmonella typhi* par cette substance, ont obtenu une diminution de 50 % du métabolisme respiratoire.

b) — *Résultats obtenus avec des substances différentes de celles que nous avons utilisées* : Nous croyons utile de mentionner ici des observations faites avec des sels, une polylysine synthétique et des extraits tissulaires.

- *Sels* : R.J. FITZGERALD et F. BERNHEIM (44) ont observé, en 1948, que des *Mycobacterium B.C.G.*, traités par le fluorure de sodium, ont un métabolisme respiratoire assez fortement augmenté. Le degré d'augmentation dépendrait de la concentration du milieu en sel et en bactéries, et aussi du pH. Le pH serait un facteur très important, puisque l'augmentation constatée par les auteurs ne se produisait que dans une gamme de pH assez restreinte ; ainsi :

- l'effet était maximum à pH 6 ;
- il était moyen à pH 6,7 ;
- il était pratiquement nul à pH 7,8.

- *Polylysine synthétique* : En 1952, W.C. BURGER et M.A. STAHMANN (19) ont étudié l'action d'un composé synthétique de lysine (polylysine) sur le métabolisme respiratoire de *Micrococcus pyogenes*, var. *aureus*. Ils avaient déposé ce produit dans la dérivation latérale de la fiole de WARBURG. Vingt-cinq minutes plus tard, alors que la respiration des germes était devenue normale, ils ont mis ceux-ci en contact avec le produit précité. Ce qu'ils ont observé alors était une inhibition complète du métabolisme respiratoire pour des concentrations de produit de l'ordre de 5 à 50 mg/ml.

La même année, E. KATCHALSKI et coll. (64, 65) ont refait, point par point, la même expérience. Les résultats obtenus ont été quelque peu différents. Cette fois, a seulement été constatée une diminution de la respiration.

- *Extraits tissulaires* :

- *Protamine et histones* : B.F. MILLER, en 1942 (75), en étudiant les propriétés antibactériennes de ces deux corps, a constaté qu'ils diminuaient et que,

parfois même, ils inhibaient complètement le métabolisme respiratoire de nombreux germes. L'auteur a également noté que la protamine était très active à pH 8 à 9, qu'elle l'était moins à pH 7 et qu'elle devenait inactive à pH 5. Les histones, de leur côté, étaient plus actifs aux pH acides. Un seul germe a été trouvé complètement résistant par B.F. MILLER : le *Proteus Vulgaris*.

- *Extraits d'organes divers* : W.L. BLOOM et F.C. BLAKE, en 1948 (9), ont constaté que le métabolisme respiratoire de *Bacillus anthracis* et de *Bacillus megatherium*, quand ces germes étaient mis en contact avec un extrait de thyroïde de porc, était inhibé *immédiatement*. Avec un colibacille, en revanche, il fallait dix-huit heures d'incubation substance-germes pour obtenir le même résultat.

En 1947, W. WEISSMAN et L.H. CRAF (125) ont eu l'idée de comparer l'action d'histones extraits du thymus de veau et celle d'un détergent cationique (ammonium quaternaire) sur le métabolisme respiratoire de *Bacillus anthracis*.

Leurs conclusions ont été les suivantes :

Le détergent cationique peut inhiber complètement la respiration du *B. Anthracis*, la lécithine étant capable de neutraliser totalement cette action.

Les histones extraits du thymus de veau peuvent inhiber complètement la respiration du *B. Anthracis*, l'acide désoxyribonucléique, extrait également du thymus, pouvant neutraliser cette action.

La lécithine retarde l'action des histones mais elle ne l'inhibe pas.

L'acide désoxyribonucléique n'a aucune action sur l'activité du détergent.

Nous ajouterons que A.S. YOUNG et coll. en 1960 (129) ont trouvé, dans le poumon de cobayes vaccinés par le B.C.G. depuis huit semaines au moins, une substance non dialysable qui était capable d'inhiber la respiration de *Bacterium tuberculosis*. Cette substance était aussi capable d'inhiber, chez des *M. tuberculosis* virulents, l'augmentation de la respiration ordinairement produite par un traitement de ces germes avec du lactate, du pyruvate ou des homogénats de poumons de cobayes non vaccinés.

Enfin, il nous faut signaler que M.G. SEVAG et R.E. MULLER, en 1948 (95), ont remarqué que des germes agglutinés — plus précisément dit, il s'agissait d'*E. Typhosa* agglutinés par un anti sérum — ont un métabolisme respiratoire identique à celui des *E. Typhosa* normaux. Quand les germes en question venaient à être lysés (par un moyen quelconque), le métabolisme respiratoire se voyait d'abord considérablement augmenté, puis il était diminué. Cette diminution pouvait aller jusqu'à 88 %.

Une dernière précision, nous n'avons pas trouvé, dans la littérature, de publication indiquant que des auteurs, avant d'étudier le métabolisme respiratoire d'un germe, avaient songé à faire subir à celui-ci un double traitement chimique.

3. — Essai d'interprétation :

Résumons, plus brièvement encore que ci-dessus, nos principales observations. Alors, nous pouvons dire ceci (en ce qui concerne les traitements simples) :

- a) — Un traitement par P II diminue fortement le métabolisme respiratoire des staphylocoques TIN et des *Salmonella typhimurium*. Il ne modifie pas celui des *Proteus morganii*.
- b) — Un traitement par le chlorure de calcium n'exerce pratiquement aucune action sur le métabolisme respiratoire des staphylocoques TIN et des *Salmonella typhimurium*. Il double celui des *Proteus morganii*.
- c) — Un traitement par la trypsine augmente le métabolisme respiratoire des trois germes, légèrement dans le cas des *Proteus morganii*, nettement dans le cas des staphylocoques TIN et des *Salmonella typhimurium*.
- d) — Un traitement par le lysozyme enfin reste, en tous cas, sans effet.

Comment expliquer l'effet inhibiteur exercé par P II sur le métabolisme des staphylocoques TIN et des *Salmonella typhimurium* ?

On pourrait penser qu'il traduit un simple effet bactéricide du produit, la quantité d'oxygène consommé étant moindre tout simplement parce qu'il y a moins de germes vivants. Mais

ce serait là une erreur. En effet, vient-on à ensementer, avant l'épreuve du WARBURG, les deux suspensions microbiennes utilisées (germes traités et germes témoins) on obtient régulièrement, avec l'une et l'autre, un nombre pratiquement identique de colonies.

Au demeurant, nous avons pu faire une même observation avec des germes traités par le chlorure de calcium, la trypsine ou le lysozyme.

On peut donc parler ici d'action « vitale ».

Mais comment pourrait-on imaginer son mécanisme intime ?

Comment le P II peut-il diminuer le métabolisme respiratoire de certaines bactéries ? Comment le chlorure de calcium et la trypsine peuvent-ils, au contraire, l'augmenter ? Comment, surtout (cf. les traitements doubles), peut-on observer, d'un cas à l'autre, des différences aussi profondes ?

On imagine bien que la réponse n'est pas facile.

A la vérité, c'est un examen général des substances utilisées qui, en ce cas, s'impose.

Le faire ici nous eut conduit trop loin et entraînait aussi un risque de redites. Nous l'avons donc placé dans un chapitre à part, qui est le chapitre récapitulatif de la seconde partie de ce travail, à savoir le chapitre VII.

CONCLUSIONS

1. — Un traitement par le P II a diminué fortement le métabolisme respiratoire des staphylocoques TIN et des *Salmonella typhimurium*. Il n'a pas modifié celui des *Proteus morganii*.
2. — Un traitement par le chlorure de calcium n'a exercé pratiquement aucune action sur le métabolisme respiratoire des staphylocoques TIN et des *Salmonella typhimurium*. Il a augmenté du double celui des *Proteus morganii*.
3. — Un traitement par la trypsine a augmenté le métabolisme respiratoire des trois germes, légèrement dans le cas des *Proteus morganii*, nettement dans le cas des staphylocoques TIN et des *Salmonella typhimurium*.
4. — En revanche, un traitement par le lysozyme est pratiquement resté sans effet.

5. — Quand les germes étudiés, au lieu d'avoir subi l'action d'une seule substance (traitement simple comme ci-dessus), avaient subi successivement l'action de deux substances (traitement double), leurs réactions pouvaient être profondément modifiées. En fait, nous avons pu constater, cette fois, la possibilité de cinq éventualités :
- a) — Le second traitement appliqué n'avait modifié en rien l'effet du premier.
 - b) — Au contraire, il avait pu renforcer cet effet.
 - c) — Il avait pu aussi le diminuer.
 - d) — D'un autre côté, il est apparu qu'un premier traitement avait le pouvoir d'inhiber l'action ordinairement produite par la seconde substance quand celle-ci se trouve appliquée sur un germe non traité au préalable.
 - e) — On a pu voir aussi qu'une substance inactive après application directe pouvait devenir active après application sur des germes qui avaient été soumis à un premier traitement.
-

DEUXIÈME PARTIE

CHAPITRE V

LES MODIFICATIONS DU POUVOIR ANTIGÉNIQUE

INTRODUCTION

L'étude du métabolisme respiratoire, faite au cours du chapitre précédent, nous a montré qu'il existait de grandes différences dans la quantité d'oxygène absorbé par des germes normaux et des germes qui, au préalable, ont été soumis à l'action de différentes substances.

En particulier, on a pu voir qu'un traitement simple par le complexe polypeptidique P II diminue, et même peut inhiber complètement, le métabolisme respiratoire des staphylocoques et des *Salmonella typhimurium*; qu'il reste en revanche sans effet sur celui des *Proteus morganii*. D'un autre côté, on a pu voir aussi qu'un traitement simple des germes par la trypsine est capable d'augmenter leur métabolisme respiratoire, les *Proteus morganii* étant, là encore, les germes qui présentent le moins de modifications.

Cela connu, il nous a paru intéressant de rechercher — nouvelle étape de notre travail — si les germes habituellement utilisés par nous conservaient, après traitement, leurs antigènes. Plus précisément, nous avons voulu élucider deux points :

1. — Des germes soumis à un traitement simple par telle ou telle substance sont-ils agglutinés de la même façon que des germes normaux quand secondairement, ils sont mis en présence d'un sérum anti obtenu, chez le lapin, après injection de germes normaux ?

2. — D'autre part, des germes normaux sont-ils agglutinés de la même façon quand ils sont mis en présence, soit d'un sérum anti obtenu, chez le lapin, après injection de germes normaux ou d'un sérum anti obtenu après injection de germes d'abord traités par telle ou telle substance ?

PARTIE EXPÉRIMENTALE

A. — Matériel :

1. — *Les suspensions de germes* : les germes retenus ont été les trois germes habituels, c'est-à-dire : le staphylocoque TIN, la *Salmonella typhimurium* et le *Proteus morganii*.

a) — *Suspensions de germes normaux* : Elles ont été faites, en eau physiologique, à partir d'une culture de vingt-quatre heures sur gélose nutritive. Concentration en germes : 5×10^8 par ml.

b) — *Suspensions de germes traités* : Des suspensions de germes préparées comme il vient d'être dit ont été mises en contact avec des solutions de P II, de chlorure de calcium, de trypsine ou de lysozyme (concentration finale dans le milieu : P II, trypsine, lysozyme : 1 mg par ml ; chlorure de calcium : M/2) puis déposées dans un bain-marie agité à 37° pendant une heure. Ultérieurement, les germes contenus dans les suspensions ont été lavés plusieurs fois par de l'eau physiologique et le dernier culot a été remis dans une quantité d'eau physiologique suffisante pour obtenir une concentration finale de : 5×10^8 germes par ml.

2. — *Les sérums anti* :

a) — *Mode de préparation des vaccins* :

— *Vaccins préparés à partir de germes normaux* :

Le germe choisi était cultivé sur boîte de Roux, contenant de la gélose nutritive, elle-même préparée suivant la technique décrite dans le chapitre III de cette seconde partie. L'ensemencement était fait en transportant, dans la boîte de Roux, une culture sur gélose inclinée âgée de vingt-quatre heures et remise en

suspension dans du bouillon ordinaire. Les boîtesensemencées étaient déposées vingt-quatre heures à 37°. A la sortie de l'étuve, la culture microbienne était reprise par 10 ml d'eau physiologique stérile, à l'aide de perles de verre également stériles. La suspension obtenue bien homogène, était répartie dans de petits flacons stériles, bouchés. Ces flacons étaient déposés pendant une heure trente minutes, dans un bain-marie à 56°. Finalement, ils étaient gardés à + 4°.

— *Vaccins préparés à partir de germes soumis à un traitement simple par les différentes substances :*

Préparation des boîtes de Roux comme ci-dessus, A la sortie des boîtes de l'étuve, les microbes présents dans chaque boîte étaient repris par 10 ml d'eau physiologique stérile. Centrifugation des germes pendant dix minutes à + 4°, à 5 000 tours par minute. Le culot microbien était remis en suspension dans une quantité d'eau physiologique stérile suffisante pour donner une concentration de 650×10^7 germes par ml. Un traitement simple était alors appliqué sur ces germes (mise en contact de la suspension bactérienne avec la solution des différentes substances utilisées, pendant une heure au bain-marie agité à 37°). Ultérieurement, lavages réitérés des germes traités, remise en suspension du dernier culot dans le volume initial (noté) d'eau physiologique stérile. Répartition dans de petits flacons stériles et chauffage, pendant une heure trente minutes, dans un bain-marie à 56°.

b) — *Vaccination des animaux :*

L'animal retenu a été le lapin. Les animaux pesaient de 2 à 2,5 kg. La vaccination était effectuée en trois semaines à raison de deux injections par semaine d'après le protocole suivant :

		diluée
1 ^{re} injection,	intra-péritonéale,	1 ml de suspension bactérienne au 1/50
2 ^e injection,	intra-péritonéale,	1 ml de suspension bactérienne au 1/25
3 ^e injection,	intra-péritonéale,	1 ml de suspension bactérienne au 1/10
4 ^e injection,	intra-veineuse,	1 ml de suspension bactérienne au 1/10
5 ^e injection,	intra-veineuse,	1 ml de suspension bactérienne au 1/5
6 ^e injection,	intra-veineuse,	1 ml de suspension bactérienne au 1/5

Après cela, l'animal était laissé au repos pendant une semaine.

c) — *Obtention du sérum anti :*

L'animal était saigné à blanc, par ponction intracardiaque ou ponction intra-carotidienne. Après centrifugation, le sérum était réparti en petites ampoules scellées et gardées à + 4°.

B. — **Technique d'agglutination utilisée :**

Agglutination spécifique en *tubes*.

Dans des tubes à hémolyse en pyrex, étaient déposés successivement 0,1 ml de sérum anti pur ou dilué (dilutions de raison 2) puis 0,9 ml de la suspension microbienne qui était mise en expérience. Les tubes étaient agités puis centrifugés cinq minutes à 3 000 tours par minute. Le culot était remis en suspension par une chiquenaude appliquée au fond du tube. Dans le cas d'un résultat négatif, la suspension montait dans le tube, en « fumée de cigarette » le mélange restant homogène. Quand, au contraire, la réaction était positive, on obtenait des agglutinats facilement visibles à l'œil nu.

C. — **Résultats :**

Nous devons d'abord mentionner, ici, deux faits importants :

- Nous n'avons jamais pu obtenir un sérum anti en injectant des germes (*Salmonella typhimurium* ou *Proteus morganii*) qui avaient au préalable été traités par la trypsine. Malgré des lavages répétés du culot microbien, les lapins sont tous morts, et en général, après la première injection intraveineuse.
- Le staphylocoque normal que nous avons utilisé s'est montré par lui-même trop peu antigénique pour que nous puissions étudier d'éventuelles modifications avec l'emploi du même germe traité.

Les résultats que nous aurons à donner ne concernent donc que les *Salmonella typhimurium* et les *Proteus morganii*. Ils seront exposés sous forme de tableaux, et notés de la façon suivante :

- une croix (+) = agglutination macroscopiquement visible ;
- un blanc () = agglutination nulle ou du moins non visible macroscopiquement.

Chacun des résultats exposés représente la moyenne de trois expériences.

La lecture des tableaux précédents montre les faits suivants :

1. — *Germes d'abord soumis à un traitement simple par telle ou telle substance puis mis en contact avec un anti-sérum obtenu par injection de germes normaux.*

a) — *Quand des Salmonella typhimurium* ont été soumises à un traitement simple par P II, leur agglutinabilité par un sérum anti est diminuée. (Limite de la dilution active pour les germes normaux : 1/409.600, pour les germes traités : 1/51.200).

b) — Même résultat quand sont utilisées des *Salmonella typhimurium* qui ont été soumises à un traitement simple par le chlorure de calcium (limite de la dilution active pour les germes normaux : 1/409.600, pour les germes traités : 1/25.600).

c) — En revanche, quand les *Salmonella typhimurium* ont été soumises à un traitement simple par la trypsine ou le lysozyme, l'agglutination observée apparaît normale.

d) — *Proteus morganii*. Un traitement préalable de ces germes par le P II, le chlorure de calcium, la trypsine ou le lysozyme ne modifie pratiquement pas l'action agglutinante normale d'un anti-sérum.

2. — *Germes normaux mis en contact avec des anti-sérums obtenus par injection de germes soumis à un traitement simple par telle ou telle substance.*

a) — Quand des *Salmonella typhimurium* normales ont été mises en présence d'un sérum anti obtenu par injection de *Salmonella typhimurium* soumises à un traitement simple par le P II, il y a diminution importante du taux d'agglutination (limite de la dilution active pour un sérum anti préparé avec des germes normaux : 1/409.600 ; pour un sérum anti préparé avec des germes traités par P II : 1/3.200).

b) — Une diminution comparable existe, bien que moins marquée, quand des *Salmonella typhimurium* normales ont été mises en présence d'un anti-sérum obtenu par injection de *Salmonella typhimurium* d'abord soumises à un traitement simple par le chlorure de calcium (limite de dilution active pour un sérum anti préparé avec des germes normaux : 1/409.600 ; pour un sérum anti préparé avec des germes traités par le chlorure de calcium : 1/12.800).

- c) — Quand des *Salmonella typhimurium* normales ont été mises en présence d'un sérum anti obtenu par injection de *Salmonella typhimurium* soumises à un traitement simple par le lysozyme, la diminution du taux d'agglutination est comparable à celle que l'on observe en utilisant le sérum anti préparé avec des *Salmonella typhimurium* traitées par P II (limite de la dilution active pour un sérum anti préparé avec des germes normaux : 1/409.600 ; pour un sérum anti préparé avec des germes traités : 1/3.200).
- d) — Quand des *Proteus morganii* normaux ont été mis en présence d'un sérum anti obtenu après injection de *Proteus morganii* traités soit par le P II soit par le lysozyme, le taux d'agglutination est pratiquement identique à celui que l'on observe en utilisant un sérum préparé avec des germes normaux.
- e) — Quand les mêmes germes ont été mis en présence d'un anti-sérum obtenu après injection de *Proteus morganii* traités par le chlorure de calcium, le taux d'agglutination devient un peu supérieur au taux normal (limite de dilution active pour un anti-sérum préparé avec des germes normaux : 1/3.200 ; pour un sérum anti préparé avec des germes traités : 1/12.800).

DISCUSSION

1. — Principaux faits observés :

- a) — Une fois de plus, nous avons pu constater que les *Proteus morganii* avaient été très peu touchés par les différents traitements appliqués. En fait, un seul résultat est digne d'être noté :
Le pouvoir agglutinant d'un anti-sérum obtenu par injection de *Proteus morganii* d'abord traités par le chlorure de calcium est légèrement supérieur à celui d'un anti-sérum préparé par injection de germes non traités.
- b) — Le pouvoir agglutinant d'un sérum anti *Salmonella typhimurium* est inférieur à la normale quand, pour la préparation de ce sérum, ont été utilisés, non des germes normaux, mais des germes d'abord traités par le P II, le chlorure de calcium ou le lysozyme.

- c) — Le traitement préalable de *Salmonella typhimurium* par le P II ou le chlorure de calcium diminue leur agglutinabilité par un anti-sérum normal.

2. — *Comparaison des résultats obtenus par nous avec ceux recueillis par d'autres auteurs.*

Nous devons citer, ici, un travail de L. COLOBERT et P. SERVANT. Ces auteurs, en 1959 (24), alors qu'ils recherchaient l'effet du lysozyme sur l'antigène somatique d'*Eberthella typhi*, ont conclu, après de nombreuses expériences faites tant *in vitro* qu'*in vivo*, que le lysozyme n'arrivait à modifier l'antigène en question que lorsque le germe avait d'abord été traité par l'EDTA (éthylènediaminetétracétique) ou qu'il avait subi un chauffage préalable. L. COLOBERT et P. SERVANT ont finalement admis que la persistance d'un pouvoir immunogène chez le germe traité indiquait que l'hydrolyse enzymatique n'avait atteint qu'un petit nombre de liaisons.

3. — *Interprétation de nos résultats.*

Si nous voulons résumer, en deux phrases, ce que nous avons pu constater au cours de ces nouvelles expériences, nous pouvons dire ceci :

- a) — Des anti-sérums obtenus par injection, chez le lapin, de germes d'abord traités par P II, le lysozyme ou le chlorure de calcium peuvent avoir, comparativement avec ceux obtenus par injection de germes normaux, un taux d'anticorps supérieur (eg. *Proteus morganii*) ou inférieur à la normale (eg. *Salmonella typhimurium*).
- b) — Mises en présence d'un anti-sérum obtenu par injection de germes normaux, des *Salmonella typhimurium*, d'abord traitées par le P II ou le chlorure de calcium, sont agglutinées moins nettement que des germes normaux.

Il apparaît par là qu'un traitement préalable par le P II, le lysozyme ou le chlorure de calcium peut :

- d'une part, modifier le pouvoir antigénique d'un germe ;
- qu'il peut, de l'autre, modifier les rapports de ce germe avec l'anticorps correspondant présent dans un anti-sérum normal.

Cela montre, une fois de plus, que les substances en question peuvent en agissant, et sans tuer les bactéries, modifier les couches superficielles de celles-ci.

Resterait à dire, maintenant, de quelle manière. Le problème sera abordé dans son ensemble, un peu plus tard, au cours de chapitre VII de la seconde partie de notre thèse.

CONCLUSIONS

1. — Le pouvoir antigénique d'un germe peut être augmenté ou diminué à l'aide d'un traitement préalable par le P II, le lysozyme ou le chlorure de calcium.
 2. — L'agglutinabilité normale d'un germe par un anti-sérum peut être diminuée quand ce germe, au préalable, a été traité par le P II ou le chlorure de calcium.
 3. — La première observation permet de parler d'une modification du pouvoir antigénique, la seconde de la mise en place de rapports nouveaux entre les antigènes présents à la surface des bactéries et les anticorps qui se trouvent dans les sérums anti.
-

DEUXIÈME PARTIE

CHAPITRE VI

MODIFICATIONS DE LA SENSIBILITÉ OFFERTE PAR LES GERMES A LA PHAGOCYTOSE

INTRODUCTION

Dans les chapitres précédents, nous avons vu que le polypeptide P II, le lysozyme, la trypsine ou le chlorure de calcium peuvent, sans entraîner leur mort, modifier différents germes, tant GRAM négatif que GRAM positif, dans leur aspect et leurs réactions. Nous avons noté, par exemple, des modifications :

- de leur agglutinabilité par le complexe polypeptidique P II ;
- de leur morphologie ;
- de leurs caractères de culture et de leurs caractères biochimiques ;
- de leur métabolisme respiratoire ;
- de leur pouvoir antigénique (spécialement en ce qui concerne les *Salmonella typhimurium*).

En revanche, est demeurée peu modifiée, dans nos conditions d'expérience :

- leur colorabilité par la méthode de GRAM.

Avant d'aborder (chapitre VII) la discussion générale de l'ensemble de nos résultats *in vitro* et, dans la troisième partie de cette thèse, l'exposé des modifications qu'un traitement analogue est à même d'apporter au pouvoir pathogène des germes, il nous a paru indispensable d'étudier la sensibilité à la phagocytose présentée, également *in vitro*, par des germes traités. Les résultats que nous avons alors obtenus font précisément l'objet de ce nouveau chapitre.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

A. — Matériel d'examen :

I. — *Les phagocytes* : Nous avons surtout utilisé des cellules qui avaient été retirées d'un exsudat inflammatoire de cobaye. Mais, parce que des recherches *in vivo*, faites parallèlement (cf. troisième partie de ce travail), nous avaient conduite à étudier le pouvoir pathogène des germes (traités ou non) chez des souris, nous avons voulu faire également quelques expériences avec des phagocytes de souris. Nous donnerons, ici, les deux techniques utilisées.

a) — *Exsudat inflammatoire de cobaye* :

— *Mode d'obtention* : En général, l'opération était faite sur trois ou quatre cobayes pesant chacun de 350 à 400 g.

A 9 heures, chaque cobaye recevait une injection intrapéritonéale de 6 ml de bouillon bactériologique stérile.

A 12 heures, il recevait une nouvelle injection intrapéritonéale du même produit sous le volume de 4 ml. Le même jour, à 14 heures, l'exsudat péritonéal, dont la formation avait été provoquée par les injections de bouillon, était prélevé à l'aide d'une grande pipette PASTEUR dont l'extrémité était taillée en biseau. Le cobaye était tenu par un aide qui tendait la peau du ventre de l'animal. La région choisie pour la ponction (en regardant le cobaye, un peu à gauche d'une ligne médiane) était épilée et une « boutonnière » de 1 cm environ était pratiquée aux ciseaux. Elle intéressait la peau et le plan musculaire sous-jacent. L'extrémité effilée de la pipette était introduite dans cette « boutonnière » (de façon à former, avec le ventre de l'animal, un angle de 30° environ), puis le péritoine était perforé. A ce moment, le cobaye était retourné, ventre en bas, et le liquide montait dans la pipette par capillarité.

Quand tout se passe normalement, dix à vingt ml d'exsudat peuvent être recueillis dans ces conditions. Il arrive parfois que du sang soit aspiré avec l'exsudat. Il est alors préférable de ponctionner l'autre flanc de l'animal ou, plus simplement, de recourir à un autre cobaye.

— *Mode de préparation de la suspension cellulaire devant servir aux expériences* : L'exsudat recueilli était filtré sur gaze, afin d'éliminer éventuellement les amas de cellules, puis centrifugé pendant trois minutes à 2 000 tours par minute dans une centrifugeuse à $+ 4^{\circ}$. Le culot était repris (eg. lavé) dans une grande quantité d'eau physiologique. Après cela, nouvelle centrifugation, nouveau lavage, et encore centrifugation. Le nouveau culot obtenu était, cette fois, remis en suspension dans une quantité d'eau physiologique telle que la concentration cellulaire était de l'ordre de 10 000 leucocytes par mm^3 . La suspension leucocytaire ainsi préparée était finalement répartie dans des tubes à hémolyse, à raison de 1 ml par tube. Ces tubes étaient mis à centrifuger à $+ 4^{\circ}$, à 2 000 tours par minute, pendant trois minutes.

b) — *Exsudat inflammatoire de souris* :

— *Mode d'obtention* : En général vingt-cinq à trente souris pesant vingt-huit à trente g étaient nécessaires. A 9 heures, injection de 1 ml de bouillon bactériologique stérile dans le péritoine de chaque souris. A 12 heures, idem.

A 14 heures, les souris étaient sacrifiées par dislocation des vertèbres cervicales. Les exsudats péritonéaux qui avaient pris naissance étaient, comme ci-dessus, extraits de la cavité à l'aide d'une pipette.

— *Mode de préparation de la suspension leucocytaire devant servir aux expériences* : Il a été identique à celui que nous avons décrit ci-dessus (cf. expériences sur les cobayes).

2. — *Le sérum* :

a) — *Sérum de cobaye* : Le sang de trois cobayes (au moins) était recueilli par ponction cardiaque. Centrifugation à $+ 4^{\circ}$, pendant dix minutes à 4 000 tours par minute. Décantation. Le sérum n'a jamais été conservé (à $+ 4^{\circ}$) plus de quarante-huit heures après le moment de l'obtention. Au moment de l'expérience, il était dilué par de l'eau physiologique, mais différemment selon le germe que nous voulions étudier. Des expériences antérieures nous avaient en effet appris que la quantité de sérum nécessaire pour que la phagocytose s'effectue dans les

meilleures conditions diffère de germe à germe.

Dilutions retenues par nous :

Pour les staphylocoques.....	1/10
Pour les <i>Salmonella typhimurium</i>	1/2
Pour les <i>Proteus morganii</i>	1/2

b) — *Sérum de souris* : Des souris étaient sacrifiées par dislocation des vertèbres cervicales et leur sang était recueilli par ponction cardiaque. Après centrifugation et décantation, le sérum était gardé à 4° pendant quarante-huit heures au maximum. Au moment de l'emploi, il était dilué dans les conditions que nous avons indiquées ci-dessus pour le sérum de cobaye.

3. — *Les suspensions de germes* : Nous avons utilisé ici, comme dans toutes nos expériences, le staphylocoque TIN, la *Salmonella typhimurium* et le *Proteus morganii*. Cette fois encore, il s'agissait de germes normaux ou de germes au préalable traités par telle ou telle substance.

a) — *Germes normaux* : Les suspensions étaient lavées plusieurs fois par de l'eau physiologique. Après la dernière centrifugation, le culot était remis en suspension dans une quantité d'eau physiologique permettant d'obtenir :

- Pour les staphylocoques, une concentration de 20×10^7 germes par ml.
- Pour les *Salmonella typhimurium*, une concentration de 10×10^7 germes par ml.
- Pour le *Proteus morganii*, une concentration de 5×10^7 germes par ml.

b) — *Germes traités* :

— *Traitement simple* : Les germes étaient ajoutés à une solution de nos différentes substances (P II, trypsine, lysozyme, chlorure de calcium. Concentration finale de produit dans le milieu : P II, trypsine, lysozyme : 1 mg par ml ; chlorure de calcium : M/2), puis la préparation était maintenue dans un bain-marie agité, à 37°, pendant une heure. Les germes étaient alors recueillis par centrifugation, puis lavés. Le dernier culot était remis en suspension dans une quantité d'eau physiologique suffisante pour conduire à une concentration de germes comparable à celle présente dans les préparations témoins.

— *Traitement double* : Un traitement simple était d'abord appliqué puis, après avoir été lavés, les germes traités étaient de nouveau mis en contact avec

l'une ou l'autre des substances étudiées. A ce moment, nouveau lavage et remise en suspension. Concentration finale : celle indiquée ci-dessus. (Des renseignements plus détaillés concernant toutes ces techniques ont été donnés dans la première partie de ce travail : *Matériel et Méthodes*).

B. — Technique expérimentale :

Elle a été la même, indépendamment de la provenance des cellules et du sérum (cobaye ou souris).

1. — *Phagocytose en tube* : Un culot leucocytaire préparé comme nous l'avons dit ci-dessus était repris par 1 ml de sérum plus ou moins dilué. 11 gouttes d'une suspension microbienne étaient ajoutées à cette préparation au moyen d'une pipette compte-gouttes. Les tubes, bouchés, étaient déposés pendant une heure dans une étuve à 37°.

2. — *Préparation et coloration des lames* : A la sortie de l'étuve le liquide présent dans les tubes était décanté et les cellules qui tapissaient le fond étaient recueillies sur un écouvillon de coton. Sur une ou plusieurs lames propres et dégraissées, on pratiquait de petites touches avec l'écouvillon chargé. Les lames étaient séchées à l'air et fixées par la chaleur. Les lames étaient ultérieurement colorées soit par le bleu de KUHN, soit par le MAY GRUNWALD GIEMSA (on trouvera, dans la première partie de cette thèse, tous les renseignements concernant ces deux techniques de coloration).

Examen microscopique à l'aide d'un objectif à immersion.

C. — Résultats :

Nous signalerons avant tout que nous n'avons pas trouvé de différence significative en ce qui concerne l'intensité de la phagocytose, selon la provenance des cellules : cobaye ou souris.

Aucune différence non plus n'a été trouvée quand étaient employés, soit le sérum de cobaye, soit le sérum de souris. Seulement, les cellules avaient, en général, un meilleur aspect, quand elles avaient été maintenues dans un sérum homologe.

Les résultats que nous allons présenter maintenant concernent exclusivement les expériences faites avec des polynucléaires inflammatoires et des sérums de cobaye. Ils sont exprimés en *pourcentage de cellules ayant phagocyté un ou plusieurs germes*. Les chiffres donnés sont les moyennes de cinq expériences. A chaque expérience, le pourcentage était effectué sur 400 cellules.

1. — *Observations faites avec les staphylocoques TIN :*a) — *Germe soumis à un traitement simple :*

TABLEAU N° 34

Nature de la substance ayant servi au traitement des germes	Pourcentage de cellules ayant phagocyté un ou plusieurs germes
P II	95 %
Chlorure de calcium	77 %
Trypsine	76 %
Lysozyme	69 %
Eau physiologique (témoin)	73 %

b) — *Staphylocoques TIN soumis à un double traitement :*

TABLEAU N° 35

Nature de la substance ayant servi au premier traitement / Nature de la substance ayant servi au traitement secondaire des germes	P II	Chlorure de calcium	Trypsine	Lysozyme
P II	95 %	96 %	98 %	98 %
Chlorure de calcium	95 %	77 %	68 %	75 %
Trypsine	100 %	93 %	79 %	73 %
Lysozyme	95 %	27 %	91 %	44 %
Eau physiologique (témoin t), germes après le traitement primaire	95 %	75 %	77 %	70 %
Rappel du témoin (T), germes avant tout traitement	73 %			

2. — *Observations faites avec les salmonella typhimurium* :a) — *Germes soumis à un traitement simple* :

TABLEAU N° 36

Nature de la substance ayant servi au traitement des germes	Pourcentage de cellules ayant phagocyté un ou plusieurs germes
P II	74 %
Chlorure de calcium	53 %
Trypsine	55 %
Lysozyme	52 %
Eau physiologique (témoin)	55 %

b) — *Salmonella typhimurium* soumises à un double traitement :

TABLEAU N° 37

Nature de la substance ayant servi au premier traitement Nature de la substance ayant servi au traitement secondaire des germes	P II	Chlorure de calcium	Trypsine	Lysozyme
P II	78 %	55 %	3 à 4 %	56 %
Chlorure de calcium	73 %	55 %	53 %	52 %
Trypsine	70 %	52 %	55 %	58 %
Lysozyme	75 %	49 %	80 %	55 %
Eau physiologique (témoin <i>t</i>), germes après le traitement primaire	72 %	54 %	57 %	52 %
Rappel du témoin (<i>T</i>), germes avant tout traitement	55 %			

3. — Observations faites avec les *Proteus morganii* :

a) — Germes soumis à un traitement simple :

TABLEAU N° 38

Nature de la substance ayant servi au traitement des germes	Pourcentage de cellules ayant phagocyté un ou plusieurs germes
P II	35 %
Chlorure de calcium	77 %
Trypsine	2 %
Lysozyme	3 %
Eau physiologique (témoin)	1 à 2 %

b) — *Proteus morganii* soumis à un double traitement :

TABLEAU N° 39

Nature de la substance ayant servi au premier traitement \ Nature de la substance ayant servi au traitement secondaire des germes	P II	Chlorure de calcium	Trypsine	Lysozyme
P II	37 %	41 %	43 %	36 %
Chlorure de calcium	74 %	83 %	67 %	79 %
Trypsine	33 %	27 %	15 %	1 à 2 %
Lysozyme	40 %	37 %	29 %	11 %
Eau physiologique (témoin <i>t</i>), germes après le traitement primaire	38 %	72 %	1 à 2 %	1 à 2 %
Rappel du témoin (<i>T</i>), germes avant tout traitement	1 à 2 %			

La lecture des tableaux précédents permet de faire un grand nombre d'observations :

1. — *Observations portant sur des germes ayant subi un traitement simple :*

- a) — Le traitement simple par P II a augmenté, de façon significative, la sensibilité à la phagocytose des trois germes mis en expérience.
- b) — Un traitement par le chlorure de calcium a augmenté la sensibilité à la phagocytose des *Proteus morganii*. Il est resté sans action sur celle des staphylocoques TIN et des *Salmonella typhimurium*.
- c) — Un traitement, enfin, par la trypsine ou le lysozyme est, dans tous les cas, resté pratiquement sans effet.

2. — *Observations portant sur des germes ayant subi un double traitement :*

a) — *Germes traités d'abord par P II :*

- *Un traitement secondaire par P II* n'a pas modifié sensiblement la sensibilité à la phagocytose des trois germes, par rapport aux témoins t. Il a augmenté cette sensibilité par rapport aux témoins T.
- *Un traitement secondaire par le chlorure de calcium* n'a eu aucune action sur la phagocytose des staphylocoques TIN et des *Salmonella typhimurium* ; en revanche, il a augmenté assez fortement celle des *Proteus morganii*, par rapport aux témoins t. Dans les trois cas, il y avait augmentation de la phagocytose par rapport aux témoins T.
- *Un traitement secondaire par la trypsine*, par rapport aux témoins t, a augmenté légèrement la sensibilité à la phagocytose des staphylocoques TIN. Il n'a pas modifié celle des *Salmonella typhimurium* et des *Proteus morganii*. Dans tous les cas il y avait augmentation de la sensibilité à la phagocytose par rapport aux témoins T.
- *Un traitement secondaire par le lysozyme* est resté, par rapport aux témoins t, dans tous les cas, sans effet. Il y avait, dans les trois cas, augmentation de la phagocytose par rapport aux témoins T.

b) — *Germs traités d'abord par le chlorure de calcium.*

— *Un traitement secondaire par P II*, par rapport aux témoins t et T, a augmenté la sensibilité à la phagocytose des staphylocoques TIN, il n'a pas modifié celle des *Salmonella typhimurium*.

Il a diminué la phagocytose des *Proteus morganii* par rapport aux témoins t, mais, par rapport aux témoins T, il y avait augmentation de la phagocytose.

— *Un traitement secondaire par le chlorure de calcium* n'a eu aucune action sur la phagocytose des staphylocoques TIN et des *Salmonella typhimurium* par rapport aux témoins t et T. Il a augmenté légèrement cette phagocytose, par rapport aux témoins t pour les *Proteus morganii*, et très fortement par rapport aux témoins T.

— *Un traitement secondaire par la trypsine* a augmenté la sensibilité à la phagocytose des staphylocoques TIN, mais n'a pas modifié celle des *Salmonella typhimurium*, par rapport aux témoins t et T.

Il a diminué celle des *Proteus morganii* par rapport aux témoins t, mais il y avait encore augmentation de la phagocytose par rapport aux témoins T.

— *Un traitement secondaire par le lysozyme* n'a pas modifié la phagocytose des *Salmonella typhimurium*, et a diminué de façon notable celle des staphylocoques TIN par rapport aux témoins t et T. Il a diminué également la phagocytose des *Proteus morganii* par rapport à t, mais, par rapport aux témoins T, il existait toujours une sensibilité à la phagocytose augmentée.

c) — *Germs traités d'abord par la trypsine :*

— *Un traitement secondaire par le P II*, par rapport aux témoins T et t, a augmenté la phagocytose des staphylocoques TIN et des *Proteus morganii*. En revanche, il a diminué, de façon notable, celle des *Salmonella typhimurium*.

— *Un traitement secondaire par le chlorure de calcium*, par rapport aux témoins t et T, a diminué très légèrement la sensibilité à la phagocytose des staphylocoques TIN. Il n'a pas modifié celle des *Salmonella typhimurium*. Il a augmenté, enfin, de façon très importante celle des *Proteus morganii*.

— *Un traitement secondaire par la trypsine*, par rapport aux témoins T et t, a augmenté légèrement la sensi-

bilité à la phagocytose des *Proteus morganii*. Il est, en revanche, resté sans effet sur celle des staphylocoques TIN et des *Salmonella typhimurium*.

- *Un traitement secondaire par le lysozyme* a augmenté la sensibilité à la phagocytose des trois germes, par rapport aux témoins T et t.

d) — *Germes traités d'abord par le lysozyme :*

- *Un traitement secondaire par P II* n'a pas modifié la sensibilité à la phagocytose des *Salmonella typhimurium* ; il a augmenté très légèrement celle des staphylocoques TIN ; et, de façon très importante, celle des *Proteus morganii*, par rapport aux témoins T et t.
- *Un traitement secondaire par le chlorure de calcium* est resté sans effet sur la sensibilité à la phagocytose des staphylocoques TIN et des *Salmonella typhimurium*. Il a augmenté très fortement celle des *Proteus morganii*, par rapport, dans tous les cas, aux témoins t et T.
- *Un traitement secondaire par la trypsine*, par rapport aux témoins T et t, n'a pas modifié la sensibilité des trois germes à la phagocytose.
- *Un traitement secondaire par le lysozyme*, enfin, a diminué la sensibilité à la phagocytose des staphylocoques ; il n'a pas modifié celle des *Salmonella typhimurium* ; il a augmenté celle des *Proteus morganii* ; par rapport aux témoins T et t, dans tous les cas.

DISCUSSION

1. — Selon notre habitude, nous commencerons par résumer les principaux faits observés :

- Nous pouvons dire d'abord qu'après un *traitement simple* par le P II la sensibilité à la phagocytose des trois germes en expérience : staphylocoques TIN, *Salmonella typhimurium*, *Proteus morganii*, a été augmentée.
Un autre cas d'augmentation a pu aussi être observé : celui-ci concerne les *Proteus morganii* traités par le chlorure de calcium.
- Après un *double traitement*, les effets obtenus ont, naturellement, été beaucoup plus complexes. Pour la clarté de l'exposé, il nous faut distinguer ici des cas caractérisés par une augmen-

tation et des cas caractérisés par une diminution de la sensibilité à la phagocytose.

a) — *Cas où il y a eu augmentation de la sensibilité :*

— *Une augmentation importante* n'a été observée que dans un cas, celui des *Proteus morganii* :
Proteus morganii traités d'abord par P II puis par le chlorure de calcium.

Proteus morganii traités d'abord par la trypsine puis par P II ou le chlorure de calcium.

Proteus morganii traités d'abord par le lysozyme puis par P II ou le chlorure de calcium.

— *Une augmentation moyenne* a été observée d'une part, avec des staphylocoques traités d'abord par le chlorure de calcium puis par P II ou la trypsine ; d'autre part, avec des *Salmonella typhimurium* et des *Proteus morganii* traités dans un premier temps par la trypsine et, dans un second temps par le lysozyme.

— *Une augmentation légère*, enfin, a pu, elle-même, être observée dans un certain nombre de cas. Par exemple : Staphylocoques TIN traités d'abord par le P II, puis par la trypsine ;

Staphylocoques TIN traités d'abord par la trypsine, puis par P II ou le lysozyme ;

Staphylocoques TIN traités d'abord par le lysozyme, puis par P II ;

Proteus morganii traités d'abord par le chlorure de calcium, puis par le chlorure de calcium ;

Proteus morganii traités d'abord par la trypsine, puis par la trypsine ;

Proteus morganii traités d'abord par le lysozyme, puis par le lysozyme.

b) — *Cas où il y a diminution de la sensibilité :*

— *Une diminution importante* a pu être notée dans plusieurs cas ; ces cas sont les suivants :
Salmonella typhimurium traitées d'abord par la trypsine, puis par P II ;

Staphylocoques TIN traités d'abord par le chlorure de calcium, puis par le lysozyme ;

Proteus morganii traités d'abord par le chlorure de calcium, puis par P II, ou la trypsine, ou le lysozyme.

— *Une diminution moyenne* a été observée avec des staphylocoques TIN traités d'abord par le lysozyme, puis par le lysozyme.

— Une diminution légère, enfin, a été relevée dans le cas des staphylocoques TIN traités d'abord par la trypsine, puis par le chlorure de calcium.

2. — *Comparaison des résultats obtenus par nous avec ceux recueillis par d'autres auteurs :*

a) — *Résultats obtenus avec des substances semblables à celles que nous avons utilisées :*

En 1955, M. MORRIS et C.V. SEASTONE (76) ont cru pouvoir signaler que la trypsine, la chymotrypsine et la papaïne étaient capables, en l'absence d'anticorps spécifiques, d'augmenter la phagocytose des streptocoques β hémolytiques. Les auteurs ont pu préciser que, dans le même temps, les différents corps étudiés n'exerçaient aucun effet apparent sur la structure des germes.

b) — *Résultats obtenus avec des substances différentes de celles que nous avons utilisées :*

— *Sels :* En 1952, J. VICTOR et coll. (120), ayant étudié l'action du citrate de sodium sur la phagocytose des *Brucella*, ont constaté une inhibition de la phagocytose.

— *Désinfectants chimiques classiques :*

Dans une thèse de Doctorat en Pharmacie, parue en 1952, (39) A. DESVIGNES a exposé des recherches concernant l'action de l'iode, du phénol, du chlorure mercurique, sur *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus mesentericus*. Il a rapporté alors que les germes cultivés en présence des substances étudiées avaient une sensibilité à la phagocytose augmentée, et cela en fonction de la concentration du produit examiné.

— *Produits biologiques :* Prenant comme point de départ les travaux de H.F. WOOD en 1951 (128) qui avait montré que la C.R.P. (C-reactive-protein), quand elle est ajoutée en petite quantité à du sérum normal, stimule la mobilité des leucocytes, Y. HOKAMA et coll. en 1961 (60), ont démontré que la C.R.P. avait aussi le pouvoir d'augmenter la phagocytose de *Serratia marcescens* comme celle des pneumocoques types XXVII et II. Y. HOKAMA et coll. ont pensé que c'est en altérant la surface des bactéries que la C.R.P. parvenait à augmenter la sensibilité à la phagocytose.

- *Composé polymérisé synthétique de lysine* (polylysine) : En 1960, D.J. BUCHANAN-DAVIDSON et coll. (17), étudiant l'action de la polylysine sur la phagocytose de certains germes, ont constaté que ce produit augmentait la phagocytose des pneumocoques types I, II et III (ce dernier légèrement), qu'il n'avait pas d'action sur la phagocytose des streptocoques β hémolytiques groupes A et C, qu'il diminuait enfin celle de staphylocoques dorés.
- Nous mentionnerons enfin un travail récent de S. SLOPEK et coll., paru en 1959 (100). Ces auteurs, étudiant l'action des leucocytes de sang de cheval sur des bactéries GRAM négatif (*Shigella*, *Salmonella*), appartenant à des souches de structure antigénique déterminée, ont constaté que les antigènes de surface (A, B, L, Vi et M) étaient capables d'inhiber la phagocytose. La destruction des antigènes en question, par exemple par la chaleur, était capable, en effet, d'augmenter l'index phagocytaire.

3. — *Essai d'interprétation de nos résultats :*

Cet essai sera fait dans le chapitre suivant qui est — nous le rappelons — le chapitre récapitulatif de la seconde partie de ce travail.

CONCLUSIONS

1. — Des germes (staphylocoques TIN, *Salmonella typhimurium*, *Proteus morganii*) traités au préalable par le complexe peptidique P II se montrent plus aisément phagocytés par des polynucléaires de cobaye (ou de souris) que des germes normaux ;
2. — Sont aussi mieux phagocytés que d'ordinaire des *Proteus morganii* qui ont été traités au préalable par le chlorure de calcium ;
3. — Le traitement consécutif d'un germe par deux substances (exemples : P II puis lysozyme, chlorure de calcium puis trypsine) peut ne modifier que légèrement la sensibilité normale de ce germe à la phagocytose ;

4. — Mais, beaucoup plus souvent, la modification produite est profonde. Elle apparaît d'ailleurs variable d'un cas à l'autre. En effet, elle peut aller dans le sens d'une augmentation (exemple : *Proteus morgani* traités d'abord par P II, puis par le chlorure de calcium), ou dans le sens d'une diminution de la sensibilité (exemple : staphylocoques TIN traités d'abord par le chlorure calcium, puis par le lysozyme).
 5. — Ce qui paraît faire le double intérêt de ces observations, c'est d'une part, que l'effet exercé par le produit n'est en aucune manière spécifique du germe comme le serait l'effet d'une opsonine. C'est, d'autre part, que les germes traités, en dépit du traitement qu'ils ont subi, restent vivants.
-

DEUXIÈME PARTIE

CHAPITRE VII

INTERPRÉTATION GÉNÉRALE DES RÉSULTATS OBTENUS IN VITRO
(et exposés dans les six chapitres précédents)

I

1. — Des travaux faits antérieurement à ceux rapportés dans cette thèse (27, 29, 30, 32, 37, 53, 55, 87, 89) nous avaient permis d'apprendre que certaines bactéries, quand elles ont été mises en contact avec une solution de *polypeptide* P II (c'est-à-dire d'un complexe isolé du thymus de veau), peuvent se trouver profondément modifiées dans leur comportement :
- a) — Au lieu de former une suspension homogène, elles ont tendance à s'agglutiner ;
 - b) — Leur métabolisme respiratoire est nettement diminué ; il peut même être inhibé ;
 - c) — Leur sensibilité à la phagocytose par des polynucléaires devient plus accusée ;
 - d) — Enfin, dans le cas où s'est exercée une action prolongée du polypeptide, il peut y avoir, finalement, mort des bactéries.

Les recherches originales, présentées dans les six chapitres précédents, ont eu pour premier avantage, celui de *confirmer* et d'*étendre* les observations en cause avec deux germes : le staphylocoque TIN et une *Salmonella typhimurium*.

2. — *Confirmation* : Ces deux germes, en effet, quand ils ont été en contact avec le polypeptide P II :

- a) — Donnent, en milieu liquide, des suspensions agglutinées (Ch. I).
- b) — Ils voient leur métabolisme respiratoire fortement diminué (Ch. IV).
- c) — Ils sont phagocytés particulièrement bien par les polynucléaires de cobaye (Ch. VI).

Extension : Nous n'avons fait aucune expérience montrant que les deux germes en question pouvaient aussi être tués par le polypeptide P II quand celui-ci avait été appliqué de façon prolongée. En revanche, des expériences d'un type nouveau nous permettent, aujourd'hui, d'ajouter, sur la foi de nos recherches avec le staphylocoque TIN et une *Salmonella typhimurium*, qu'un germe qui a été traité par le polypeptide P II peut également être transformé :

- dans sa morphologie (Ch. II) ;
- dans ses caractères de culture et ses caractères biochimiques (Ch. III) ;
- dans son pouvoir antigénique (Ch. V).

Cela étant établi au-delà de toute discussion possible par de très nombreuses expériences, on doit obligatoirement admettre que le polypeptide P II est une substance capable d'exercer, *in vitro*, un assez grand nombre d'effets antibactériens.

Mais, deux questions, maintenant, se présentent à nous qui demandent réponse :

- Est-ce la première fois que des propriétés antibactériennes sont reconnues pour un corps polypeptidique ?
- Comment un corps polypeptidique peut-il se montrer antibactérien ?

3. — Nous avons déjà fourni des éléments de réponse à la première question dans la première partie de cette thèse.

Nous sommes sans doute la première à avoir constaté qu'un polypeptide (comme le complexe polypeptidique P II) peut augmenter la sensibilité d'un germe à la phagocytose, qu'il peut altérer son pouvoir antigénique. Là, toutefois, s'arrête notre antériorité. Avant nous — ou en même temps que nous — d'autres auteurs ont pu dire — eux aussi — que certains polypeptides basiques extraits de tissus, différents certes mais peu éloignés cependant de celui que nous avons utilisé, peuvent se montrer antibactériens. Par exemple :

- en faisant perdre leur pigment à des germes pigmentés ;
- en lysant des germes saprophytes ;

— en diminuant la virulence de quelques germes pathogènes, etc...

Dans la première partie de ce travail, nous avons donné le nom des auteurs en question. D'autres noms pourraient encore être trouvés dans une publication récente de J.K. SPITZNAGEL (112). Par là, il apparaît, que non seulement le polypeptide P II que nous avons personnellement utilisé, mais encore d'assez nombreux *polypeptides basiques* ont bien droit au qualificatif de *principes antibactériens*. Resté, cela dit, à répondre à la seconde question : *Comment de tels principes peuvent-ils exercer des actions antibactériennes ?* La réponse est évidemment ici plus difficile à donner. Il faut pourtant essayer. Avec l'espoir d'avoir apporté, dans notre discussion, le maximum de clarté, nous considérerons seulement ce qui concerne le pouvoir agglutinant des polypeptides (reconnu, avec nous, par tous les auteurs). Comment ces substances peuvent-elles, *in vitro*, agglutiner les bactéries présentes dans une suspension jusqu'alors homogène ? Il tombe sous le sens que, si une explication peut être donnée, on pourra non moins l'appliquer aux autres effets signalés : modifications du métabolisme respiratoire, de la sensibilité à la phagocytose, etc...

1. — Un fait avant tout autre mérite mention, car c'est de son existence que va dépendre toute la suite de notre discussion : les polypeptides basiques (cationiques), comme le P II, *ont le pouvoir de se fixer sur les bactéries*.

a) — Dans le passé (88), nous avons déjà été capable nous-même d'apporter un certain nombre de preuves en faveur de la réalité de cette fixation :

— Quand des germes qui ont d'abord été traités par le P II sont secondairement mis en suspension dans de l'eau physiologique, ils restent agglutinés ;

— Quand le *Micrococcus lysodeikticus* a d'abord été traité pendant cinq heures par le P II il devient, même après lavage, insensible à l'action lytique du lysozyme ;

— Quand des bacilles typhiques ont d'abord été traités par le P II, ils deviennent incapables d'adsorber l'anticorps spécifique et le complément.

— Enfin, nous avons vu qu'en employant de fortes concentrations de germes, on pouvait « épuiser » une solution de polypeptide. Le surnageant n'a plus alors de pouvoir agglutinant. Il ne précipite plus en présence de sérum frais de cobaye comme le fait normalement une solution de P II.

b) — En 1961, d'autres preuves ont pu être fournies par J.K. SPITZNAGEL (111, 112, 113), cet auteur ayant eu recours, pour sa démonstration, à l'emploi d'une méthode de coloration particulière. Celle-ci était fondée sur la coloration verte que donne le *fast-green* quand ce colorant est utilisé à pH 8,1 (la méthode en question n'était rien d'autre qu'une modification de celle mise au point par M. ALFERT et I.I. GESCHWIND (1) pour la coloration histochimique des histones).

Avec elle, J.K. SPITZNAGEL a étudié la fixation des histones du thymus de veau (et, accessoirement, d'autres polypeptides cationiques) sur diverses bactéries, en particulier, *E. coli* et *B. anthracis*. Dans ces conditions, il a constaté :

- Que la fixation en cause se faisait à la surface des bactéries, dans la paroi bactérienne et parfois aussi dans la membrane cytoplasmique, avec extension dans la capsule aux fortes concentrations d'histones ;
- Qu'elle pouvait être inhibée par des substances anioniques telles que : acides nucléiques, mucine gastrique, acide hyaluronique, sérum albumine, etc...

J.K. SPITZNAGEL a remarqué, en outre, que la coloration par le « fast-green » des bactéries traitées par des histones accompagnait une perte de vitalité des bactéries et une inhibition de leur activité respiratoire. Elle pouvait donc être un test applicable à l'étude des interactions bactéries-polypeptides cationiques *in vivo* (d'où mise en route de recherches *in vivo*). Nous aurons à parler de ces recherches dans la troisième partie de ce travail.

5. — Voici donc un premier fait d'ores et déjà acquis : *Les polypeptides basiques, e. g. le polypeptide P II, peuvent se fixer sur les bactéries.* Reste à dire à présent comment arrive à se produire une telle fixation.

Un certain nombre d'explications ont déjà été données :

a) — Pour certains auteurs, il y aurait combinaison de la substance polypeptidique avec des constituants, acides ou non, de la surface bactérienne [T.D. BROCK, 1958 (16) ; R.C. SKARNES et D.W. WATSON, 1956-57 (97, 98) ; W.C. BURGER et M.A. STAHMANN, 1952 (19) ; B.A. NEWTON, 1954-55 (82, 83) ; J. GUILLAUME, R. OSTEUX et J.C. DERIEUX, 1961 (52) ; L.A. ARDOINO et M.F. MELDOLESI, 1958 (4)].

- b) — Pour d'autres, il y aurait combinaison du polypeptide cationique avec des groupements anioniques présents, soit sur la surface cellulaire, soit plus profondément comme le sont les groupements phosphoriques d'acides nucléiques [T. SUGIMURA et T. ONO, 1956 (117) ; W.L. BLOOM, M.G. WINTERS et D.W. WATSON, 1951 (11) ; E. KATCHALSKI, L. BIOCHOVSKI-SLOMNITZKI et B.E. VOLCANI, 1952 (64, 65) ; B.A. NEWTON, 1954 (82)].
- c) — Ont encore été mis en avant : une simple action détergente [B.F. MILLER, R. ABRAMS, A. DORFMAN et M. KLEIN, 1942 (75) ; B.A. NEWTON, 1955 (83) ; A.V. FEW et J.H. SCHULMAN, 1953 (43)], une chélation des groupements sulfatés [J.C. HIRSCH, 1954 (56)], une interférence avec des cations [T. SUGIMURA et T. ONO, 1956 (117)], une activité enzymatique sur des complexes mucoïdiques de la surface cellulaire [M.R.J. SALTON, 1957 (92)]. Nous avons déjà eu l'occasion de parler des hypothèses présentées par D.J. BUCHANAN-DAVIDSON et coll., 1960 (17, 18).

Quelle est, cependant, notre opinion personnelle ? Celle-ci : Essentiellement, la fixation d'une substance polypeptidique (e.g. du polypeptide P II) tiendrait à la mise en place de liaisons électrovalentes entre, d'une part, les groupements cationiques de la substance en question et, de l'autre, les groupements anioniques de la bactérie.

Parmi les groupements anioniques, nous estimons qu'il faut exclure ceux qui appartiennent aux *acides nucléiques*. Ces substances, certes, sont très abondantes dans le corps bactérien. Mais elles n'existent que dans les couches profondes. Devraient, en revanche, être pris en considération :

- Les groupements anioniques de l'*acide muramique* ;
- Ceux appartenant aux acides diaminés de la fraction peptidique des *mucopeptides* (acides aspartique, glutamique, diaminopimélique, etc.).
- Ceux des phospholipides qui sont particulièrement abondants chez les germes GRAM négatif ;
- Devraient être ajoutés, enfin, les groupements anioniques attachés à des acides présents dans diverses espèces bactériennes (acides teichoïque, colominique, etc.).

Ces différents groupements jouent certainement, ici, le rôle primordial. Mais, à en juger du moins par les faits rapportés par J.K. SPITZNAGEL, les polypeptides dont nous parlons ici pourraient encore établir des liaisons avec certaines substances appartenant à la *membrane cytoplasmique*. Si cela est vrai, on

pourrait admettre que les liaisons qui, alors, prennent place se font avec les groupements anioniques des phospholipides (qui sont, dans la membrane, des constituants très abondants), par exemple ceux qui appartiennent aux acides phosphatidiques, à la phosphatidylsérine, aux phospho-inositols, etc.

Quelques auteurs ont signalé que les polypeptides pourraient agglutiner des *germes encapsulés*. Parmi les constituants à groupements anioniques que l'on peut trouver dans une capsule bactérienne, nous citerons au moins l'*acide hyaluronique* (chez certains streptocoques), le *glutamylpolypeptide* (chez *B. subtilis* et *B. anthracis*, etc.).

6. — Maintenant, il convient de franchir un nouveau pas. *Comment la fixation d'une substance polypeptidique* (e. g. polypeptide P II) *peut-elle entraîner une agglutination bactérienne*? À notre avis, cet effet résulterait d'une double action :

- l'une, s'exerçant sur la charge électrique de la bactérie,
- l'autre, sur la solvation.

a) — *Action sur la charge électrique.*

Celle-ci se comprend sans peine, compte tenu de ce que nous disions il y a un instant : En se fixant sur eux, les groupements cationiques du P II vont nécessairement neutraliser les groupements anioniques de la surface bactérienne.

Cela dit, comment expliquer l'existence d'une *dose agglutinante minimale* et d'une *dose agglutinante maximale*? Nous répondrons ainsi : La *dose agglutinante minimale* est celle qui a suffi à neutraliser, dans une proportion suffisamment forte, la charge négative de la suspension bactérienne.

Que se passe-t-il quand on augmente cette dose? Evidemment ceci. À partir d'une certaine dose, la charge électrique des bactéries est toute entière annulée. Mais, avec une dose encore plus forte, le phénomène inverse commence à se dessiner. Apparaissent alors des groupements cationiques libres. Autrement dit, apparaît une charge positive qui a tendance à augmenter. Mais, à un certain moment, la charge positive sera si élevée que les répulsions électrostatiques deviendront suffisantes pour assurer, à nouveau, la stabilité des suspensions. Dès lors, il n'y aura plus d'agglutination. En d'autres termes, on aura dépassé la *dose agglutinante maximale*.

Il va sans dire que, plus une bactérie est « chargée », autrement dit, plus nombreux sont les groupements anioniques qui sont présents à sa surface, plus élevée doit être la dose de P II nécessaire pour entraîner une agglutination.

b) — *Action sur la solvation.*

Dans les couches superficielles des bactéries, existent des lipoprotéines, des glycoprotéines, des polysaccharides, soit autant de substances qui peuvent attirer et fixer un certain nombre de molécules d'eau présentes dans le milieu ambiant. Cela fait que se dessine autour d'elles une sorte de gaine, les molécules d'eau constituant cette gaine n'étant plus soumises à l'agitation brownienne. On imagine bien que cette gaine n'est pas, elle aussi, sans jouer un rôle. En fait, dans le cas particulier qui nous occupe, elle s'oppose nécessairement aux effets de l'abaissement de la charge électrique superficielle et empêche l'accolement étroit des bactéries qu'exige, pour se produire, une agglutination.

Mais, dans quelle mesure la gaine en question peut-elle être influencée par une fixation de P II ? C'est ce qu'il nous faut voir à présent.

Deux possibilités existent :

- Ou bien la bactérie étudiée possède une surface hautement hydrophile. En ce cas, parce qu'il est relativement pauvre en groupements polaires, le P II va provoquer, en se fixant sur la bactérie à côté d'une diminution de la charge électrique, une diminution d'hydrophilie. Bien entendu, cette diminution ne peut qu'être, elle aussi, favorable à l'agglutination.
- Ou bien la bactérie possède une surface faiblement hydrophile. En ce cas, P II, en se fixant sur cette surface, va permettre aux groupements aminés libres de sa molécule de contracter des liaisons dipolaires avec un certain nombre de molécules d'eau. Par là, même, la surface bactérienne va acquérir une hydrophilie supérieure à celle qu'elle avait auparavant.

Il est bien évident que ces diverses possibilités sont de nature à influencer, en dernière analyse, les caractères d'une agglutination. Ainsi, dans le premier cas (cas où la surface bactérienne est très hydrophile), ce que l'on remarquera, c'est une dose agglutinante maximale relativement basse par rapport à la dose agglutinante minimale ; autrement dit, la zone d'agglutination est étroite.

Un exemple ici, c'est ce que nous avons pu voir au cours de nos expériences avec la *Salmonella typhimurium*.

Au contraire, dans l'autre cas (cas où la surface bactérienne est très peu hydrophile) — cf. ; dans nos expériences, ce que nous avons vu avec le staphylocoque TIN — la dose agglutinante maximale tend à s'éloigner de la dose agglutinante minimale, on se trouve en présence d'une zone d'agglutination large.

Ces deux grands effets produits par la fixation d'un polypeptide (e.g. polypeptide P II) à savoir :

L'abaissement de la charge électrique superficielle des bactéries,

Une modification de l'état de solvation,

seraient suffisants à eux seuls pour entraîner une perte de l'homogénéité des suspensions bactériennes, donc pour produire une agglutination des germes. Mais, il tombe sous le sens que, dans la réalité, les choses doivent être un peu plus compliquées. En outre, nos bactéries n'étaient pas des particules inertes. Elles étaient vivantes, et comme telles, elles pouvaient répondre à la fixation de P II par des réactions propres de leur métabolisme. Ces réactions, une fois en place, étaient capables de modifier l'ionisation des constituants de la surface cellulaire. C'est ainsi que S. BAZIN et S. ALLIOT COUADE (5, 6) et N. CHOUCROUN et H. PLOTZ (20) ont pu voir que des bactéries vivantes peuvent (jusqu'à un certain point) maintenir constante leur charge électrique, en dépit d'un apport d'ions dans le milieu extérieur, alors que, dans le même temps, des bactéries tuées ne le peuvent pas. Malheureusement, dans le cas du P II, il nous est encore impossible de dire quelle pourrait être la nature de semblables modifications réactionnelles.

7. — Jusqu'à présent, pour rendre notre discussion plus facile à suivre, nous avons considéré seulement ce qui concernait la production d'une *agglutination* par fixation à la surface bactérienne du polypeptide P II. Pareille agglutination traduit, en dernière analyse, une modification de même ordre qui pourrait également expliquer pourquoi les germes recouverts de P II deviennent plus aisément *phagocytés* ? Certainement oui.
8. — Et comment, maintenant, expliquer pourquoi des bactéries recouvertes de P II présentent le plus souvent des modifications de leur forme, de leurs caractères biochimiques, de leurs caractères antigéniques... Pourquoi, aussi, leur métabolisme respiratoire est, si souvent, sérieusement troublé ? C'est, bien évidem-

ment, parce que la cuticule de polypeptide qui, désormais, les enferme comme un corset trouble leurs échanges avec le milieu extérieur. Conséquences : leurs différents métabolismes sont troublés. Finalement, ils pourront l'être à un point tel que la mort s'ensuivra.

9. — Avec deux germes (le staphylocoque TIN et la *Salmonella typhimurium*) nous avons été capable, disions-nous en commençant cet exposé, de *confirmer* et d'*étendre* des travaux antérieurs à ceux rapportés dans cette thèse.

Le troisième germe que nous avons retenu pour nos nouvelles expériences : le *Proteus morganii*, devait, lui, nous réserver une surprise.

En effet, à la différence de tous ceux que nous avons eu l'occasion d'examiner jusqu'alors, à la différence du staphylocoque TIN et de la *Salmonella typhimurium*, il est resté, lui, insensé (du moins dans la majorité des cas) à l'action de P II.

Notre premier mouvement, devant un fait aussi inattendu, fut de déception. Mais notre tranquillité est revenue quand nous avons appris par la lecture de travaux publiés au moment même où étaient faits les nôtres, que ce cas, qui nous paraissait singulier pour le *Proteus morganii* était, en fait, celui de tous les *Proteus*. Il est même curieux de constater ici l'unanimité des auteurs. Resterait, évidemment, à dire pourquoi les *Proteus* ont un comportement différent de celui des autres germes. La chose reste impossible. Aucun auteur étranger, jusqu'à présent du moins, n'a pu fournir d'explication valable. Et nous même, nous n'avons pas d'avis à formuler.

II

Le but de cette thèse — nous l'avons indiqué dans notre introduction — était, d'abord, d'étudier les effets exercés *in vitro* par le polypeptide P II sur différents germes. Mais — comme nous l'avons indiqué aussi — nous demandions encore à notre travail de nous dire si d'autres substances chimiques — bien que différentes de P II — peuvent, elles-mêmes, exercer des effets antibactériens, à savoir le *chlorure de calcium*, la *trypsine* et le *lysozyme*.

Au cours des six chapitres précédents, nous avons eu l'occasion de dire ce qu'avaient été nos observations sur ce nouveau point. Mais c'était, nécessairement, de manière analytique. Nous donnerons ici une *synthèse*, cette synthèse — comme on le verra — conduisant à des données positives, nous essaierons, dans une seconde partie, d'imaginer comment les trois corps étudiés peuvent, pour leur part, exercer des effets antibactériens.

A. — Effets antibactériens exercés *in vitro* par le chlorure de calcium, la trypsine et le lysozyme.

1. — Le chlorure de calcium.

- a) — Quand on ajoute une solution de P II à une suspension de *Proteus morganii* normaux, cette suspension reste homogène. Une agglutination, en revanche, prend place quand les mêmes germes ont d'abord été traités par du chlorure de calcium (concentration agglutinante maximale : 0,66 mg ; concentration agglutinante minimale : 0,0033 mg).
- b) — Quand des *Salmonella typhimurium* ont été traitées, de leur côté, par du chlorure de calcium, 30 à 40 % d'entre elles deviennent granuleuses.
- c) — L'épreuve de la staphylocoagulase faite sur des staphylocoques TIN qui ont d'abord subi l'action du chlorure de calcium demande, pour se faire, une durée supérieure à la durée normale (une heure au lieu de trente minutes).
- d) — Après action du chlorure de calcium, le *Proteus morganii* peut faire fermenter le saccharose et le maltose. En revanche, il n'a plus d'action sur le lactose.
- e) — Le métabolisme respiratoire de *Proteus morganii*, quand ce germe a été traité par le chlorure de calcium, est augmenté (consommation d'oxygène par heure : 12 à 13 μ l au lieu de 7 à 8 μ l).
- f) — La *Salmonella typhimurium* qui a été traitée par le chlorure de calcium d'une part, se montre moins antigénique chez le lapin et, de l'autre, se montre moins agglutinable par un antiserum obtenu dans les conditions normales.
- g) — Au contraire, des *Proteus morganii*, après traitement par le chlorure de calcium, se montrent plus antigéniques que des *Proteus morganii* normaux.
- h) — Le *Proteus morganii* est normalement mal phagocyté par les polynucléaires de cobayes. Il devient au contraire aisément phagocyté quand il a été traité par du chlorure de calcium.

2. — La trypsine.

- a) — On sait que les suspensions du staphylocoque TIN et de la *Salmonella typhimurium* sont normalement agglutinables par le polypeptide P II. Quand, avant d'être mis

au contact du polypeptide, ces germes ont été traités par la trypsine, une agglutination prend encore place. Mais celle-ci apparaît un peu différente de l'agglutination normale. Ainsi, pour le staphylocoque TIN, il y a diminution de la concentration agglutinante maximale active de P II, et, pour la *Salmonella typhimurium*, augmentation de la concentration minimale. Le *Proteus morganii* normal, qui n'est pas agglutinable par le P II, le devient quand, au préalable, il a été traité par de la trypsine.

- b) — Des staphylocoques TIN d'abord traités par la trypsine font fermenter le saccharose et le glucose moins activement que les mêmes germes non traités. Avec les germes traités, on note une prolongation de l'épreuve de la staphylocoagulase. Le *Proteus morganii*, traité par le même enzyme, acquiert, lui, le pouvoir de faire fermenter le maltose.
- c) — Le staphylocoque TIN, la *Salmonella typhimurium* et le *Proteus morganii*, après traitement par la trypsine, ont un métabolisme respiratoire augmenté par rapport à la normale.

3. — Le lysozyme.

- a) — La concentration minimale de P II nécessaire pour provoquer une agglutination du staphylocoque TIN augmente quand ce germe a été traité par le lysozyme. Même observation avec notre *Salmonella typhimurium*.
- b) — Des staphylocoques TIN, d'abord traités par le lysozyme, font fermenter, plus activement que de coutume, l'amidon. La *Salmonella typhimurium*, le *Proteus morganii*, traités par le même enzyme, acquièrent le pouvoir de faire fermenter, la première, le lactose, le second, le maltose.
- c) — Quand des *Salmonella typhimurium* ont d'abord été traitées par le lysozyme, elles perdent la majeure partie de leur pouvoir antigénique.

De la brève synthèse qui précède, on peut sans peine tirer des conclusions générales.

Le seul traitement d'un germe par le chlorure de calcium, la trypsine et le lysozyme est capable souvent, sans tuer celui-ci, de modifier ses propriétés et son comportement. Tous ces corps peuvent donc être considérés, comme le polypeptide P II, comme doués d'effets antibactériens.

Mais il faut bien ajouter que les effets produits n'ont pas le même mécanisme.

Que peut-on dire aujourd'hui de celui-ci ? Nous présenterons les faits connus ou imaginables dans le paragraphe suivant.

B. — Mode d'action, dans les effets antibactériens qu'ils peuvent exercer in vitro, du chlorure de calcium, de la trypsine et du lysozyme.

1. — Le chlorure de calcium.

Selon toute vraisemblance, cette substance brise les complexes glucides-protides ou lipides-protides qui se trouvent à la surface des bactéries en détruisant les liaisons hydrogènes qui existaient entre ces composés macromoléculaires. En conséquence, se voient libérés dans le milieu un ou plusieurs composants bactériens. Ainsi (observation personnelle), quand des *Proteus morganii* ont été traités par le chlorure de calcium, ils libèrent une certaine quantité de lipopolysaccharide spécifique primitivement contenu dans leur paroi.

Quelles conséquences pourrait avoir un tel processus ? Deux au moins, sont aisément imaginables, l'une concernant la charge électrique, l'autre l'état de solvation des surfaces bactériennes.

a) — Modifications de la charge électrique.

Selon les cas, cette charge électrique sera abaissée ou augmentée. Elle sera *abaissée* quand les substances libérées sous l'effet du chlorure de calcium étaient porteuses de groupements anioniques. Dans ce cas, on pourrait s'attendre à une agglutination des germes par des concentrations en P II plus basses que normalement. C'est bien là, effectivement, ce que nous avons pu observer un certain nombre de fois. Ainsi, le P II, qui n'est pas capable d'agglutiner des *Proteus morganii* normaux, peut le faire quand ce germe a d'abord été traité par le chlorure de calcium.

A l'opposé, la charge électrique des bactéries sera *augmentée* quand les substances qui ont été enlevées par le sel étaient de celles qui bloquent normalement des groupements anioniques. Alors, pour provoquer une agglutination, il faudra faire intervenir des quantités de P II qui, cette fois, seront anormalement élevées. Une telle éventualité, nous ne l'avons jamais constatée après traitement simple des germes par le chlorure de calcium. En revanche, nous l'avons rencontrée — au cours de nos

expériences sur les traitements doubles — quand du chlorure de calcium venait atteindre des bactéries qui avaient été déjà traitées par la trypsine ou le lysozyme.

b. — *Modifications de la solvation.*

L'hydrophilie sera augmentée quand la substance enlevée par le chlorure de calcium sera moins hydrophile que celles qui subsistent sur la surface bactérienne. Dans ces conditions, ce que l'on doit observer c'est une diminution de la sensibilité des bactéries traitées par le P II. Effectivement, c'est ce que nous avons pu voir, cette fois encore, au cours de nos expériences avec des traitements doubles (cf : ce qui s'est passé avec le *Proteus morganii*, voir plus loin).

2. — *La trypsine.*

La trypsine étant un enzyme protéolytique, doit être capable — et il l'est en effet — de provoquer une hydrolyse des composés protéiques ou polypeptidiques présents à la surface bactérienne (action directe). Quand, à ces composés, étaient liés des constituants d'une autre nature (polysaccharides, lipides), ceux-ci se trouvent libérés (action indirecte). Ils peuvent donc quitter la bactérie et passer dans le milieu ambiant. Nous ajouterons à cela quelques précisions.

a) — *Action directe.*

Quand elle détruit un composé cationique, la trypsine augmente la charge de la surface bactérienne, cette action, bien entendu, étant d'autant plus forte que le composé en question se trouvait plus fortement engagé dans des combinaisons avec des groupements anioniques dans la surface bactérienne. En somme, ce qui se produit en ce cas, c'est un « déblocage » de groupements anioniques.

Si, au contraire, la trypsine détruit un composé anionique, ce qui se produit, c'est une diminution de la charge électrique.

A cela, il faut ajouter que l'élimination des composés protidiques sous l'effet de la trypsine entraîne nécessairement, selon la nature du corps hydrolysé, soit une augmentation, soit une diminution de l'état d'hydrophilie de la surface bactérienne.

b) — *Action indirecte.*

Cette action, avons-nous dit, se caractérise, après élimination d'un composé peptidique, par la libération dans le milieu ambiant de certains constituants de la surface bactérienne. Là encore, on imagine sans peine les conséquences. Selon les cas, il y aura augmentation ou diminution de la charge électrique de la surface bactérienne, et, indépendamment, augmentation ou diminution de l'état d'hydrophilie. Mais c'est bien là, effectivement, ce qu'ont révélé nos expériences. Témoins ces deux exemples.

— La dose agglutinante minimale de P II a été augmentée, la zone d'agglutination a été raccourcie, dans le cas où l'expérience était faite avec des *Salmonella typhimurium* traitées par la trypsine. La première modification tenait manifestement à une augmentation de la charge électrique de surface (par élimination d'une substance peptidique qui bloquait des groupements anioniques), la seconde à une diminution de la solvation.

— Expériences avec le *Proteus morganii*.

Ce qui, ici, on se rappelle, a été frappant, c'est l'apparition d'une agglutination du germe par P II. Pourquoi ? Très probablement parce que le composé peptidique détruit par la trypsine avait provoqué un abaissement de la charge de la surface bactérienne. Toutefois, un autre phénomène aurait pu, lui aussi, se produire. Par exemple, comme cela a été observé pour le chlorure de calcium, une mise en liberté de lipopolysaccharide.

3. — *Le lysozyme.*

Le mode d'action du lysozyme est, aujourd'hui, parfaitement connu. On peut même dire qu'il fait partie des domaines actuellement classiques de la Microbiologie.

L'action du lysozyme sur une surface bactérienne est double. La substance agit, d'une part, comme enzyme, de l'autre, comme polypeptide cationique.

a) — *L'action enzymatique du lysozyme porte essentiellement au point de liaison entre l'acide muramique et la glucosamine présente dans la fraction glucidique du mucopeptide de la paroi bactérienne. En brisant cette liaison, le lysozyme agit, en somme, comme une endoglucosa-*

minidase. En conséquence, se trouvent démasqués les groupements anioniques de l'acide muramique, ceux-ci étant normalement engagés dans une liaison avec la glucosamine au sein du mucopeptide. Mais ce phénomène peut être plus ou moins marqué.

— Quand l'action de l'enzyme reste limitée à quelques liaisons, apparaît seulement une augmentation des groupements anioniques de la surface bactérienne, donc une augmentation de charge électrique. Cette augmentation se traduira nécessairement par une augmentation de la dose de P II capable de provoquer une agglutination. Effectivement, c'est ce que nous avons constaté alors que nous opérons avec le staphylocoque TIN et la *Salmonella typhimurium*.

— Quand, au contraire, l'action de l'enzyme a porté sur l'ensemble des liaisons acide muramique-glucosamine, le mucopeptide de la paroi se voit, en pratique, totalement détruit et, ce qui se produit, c'est une lyse cellulaire. Au cours de nos expériences personnelles, nous n'avons pas eu à constater une lyse de cet ordre après traitement simple par le lysozyme, mais nous avons pu la constater après mise en œuvre de traitements doubles.

b) — Comme *polypeptide cationique*, le lysozyme doit agir, en bref, d'un manière assez semblable à celle du P II, et cela, parce qu'il a le pouvoir de se fixer, lui aussi, sur les groupements anioniques de la surface bactérienne. Toutefois, son caractère cationique étant (semble-t-il) moins marqué, son influence sur la charge électrique de la bactérie devrait être nettement inférieure à celle du P II.

Effectivement, avec nos germes, nous n'avons jamais observé la mise en place *in vitro* sous l'effet du lysozyme, d'une agglutination bactérienne.

III

Dans la première partie de ce chapitre, nous avons résumé, puis interprété, les faits observés en étudiant les actions exercées *in vitro* sur des germes vivants par notre complexe polypeptidique P II. Dans la seconde partie, nous avons aussi résumé, puis interprété, les faits observés avec les mêmes germes mais soumis cette fois à l'action du chlorure de calcium, de la trypsine ou du lysozyme. Ces corps, avons-nous vu, altè-

rent essentiellement la surface bactérienne. Cette surface étant altérée, prennent place des troubles de la perméabilité qui engendrent eux-mêmes des modifications métaboliques (cf. : métabolisme respiratoire, activité enzymatique).

Le lecteur a pu voir que tous les corps mis en expérience étaient capables d'exercer des effets antibactériens mais que, d'un corps à l'autre, d'un germe à l'autre, les effets produits étaient différents, le fait dépendant et du mode d'action du corps et de la structure du germe.

Cela connu, il était évidemment tentant de rechercher ce qui se passerait si, au lieu de soumettre un germe donné à l'action d'une seule substance, on le soumettait, tour à tour, à l'action de deux substances différentes. Nous avons fait les expériences. Dans les six premiers chapitres de cette seconde partie, nous avons, chemin faisant, publié nos observations. Mais, dans tous les cas, sous forme analytique. Le moment est venu de faire la synthèse. On la trouvera dans les lignes suivantes.

Il aurait peut-être été souhaitable de compléter cette synthèse par un essai d'interprétation. Nous nous y sommes effectivement essayée, ce qui n'a pas été, au demeurant, sans nous apporter un gros surcroît de travail. Cependant, au moment de publier notre essai, une crainte nous est venue. Trop complexes, nos interprétations n'avaient plus aucune clarté. Nous avons donc jugé préférable de ne pas les rapporter ici.

Les faits, seuls, seront exposés dans les lignes qui suivent.

Germes utilisés : Staphylocoques TIN, *Salmonella typhimurium*, *Proteus morganii*.

Corps chimiques appliqués sur les germes : Polypeptide P II, chlorure de calcium, trypsine, lysozyme.

Quand l'un des trois germes indiqués (et vivants) avait été soumis à l'action successive de deux substances, les faits observés différaient le plus souvent de ce qu'ils sont quand une substance seulement avait été mise en œuvre. En fait, il est ressorti de nos expériences que six grandes éventualités pouvaient se produire.

1. — Le second traitement appliqué avait renforcé l'action du premier ;
2. — Il avait diminué ou même inhibé complètement l'action du premier ;
3. — Le premier traitement appliqué avait renforcé l'action normale du second ;
4. — Le même traitement avait, au contraire, empêché cette action ;
5. — Le premier traitement appliqué avait permis au second d'exercer un effet nouveau ;
6. — Enfin, les deux traitements étaient restés, tous deux, sans action. De tout cela, nous donnerons quelques exemples.

PREMIER CAS : *Le second traitement appliqué a renforcé l'action du premier.*

Ce cas, nous avons pu l'observer en utilisant pour l'expérience, soit deux fois la même substance, soit deux substances différentes.

a) — *Utilisation, à deux reprises, de la même substance.*

Exemples :

- Quand, à deux reprises, des *Salmonella typhimurium* ont été traitées par le lysozyme, elles deviennent insensibles au contact du polypeptide P II. Autrement dit, elles ne sont plus agglutinables par cette substance.
- Quand, à deux reprises, des *Proteus morganii* ont été traités par le chlorure de calcium, ils deviennent mieux agglutinables par P II. On note un élargissement de la zone d'agglutination à la fois par diminution de la concentration agglutinante minimale et par augmentation de la concentration agglutinante maximale. De ce phénomène, nous avons indiqué, précédemment, les raisons : se produisent en même temps, une diminution de la charge électrique et une augmentation de l'hydrophilie.

b) — *Utilisation de deux substances différentes.*

Exemples :

- Quand une *Salmonella typhimurium* d'abord traitée par le P II se voit traitée ensuite par le lysozyme, il y a augmentation de la concentration agglutinante maximale par le polypeptide P II. Il paraît raisonnable de penser que le lysozyme agit principalement ici par sa nature cationique et en augmentant l'hydrophilie. En effet, on ne voit guère comment son action enzymatique pourrait s'exercer à travers la couche de P II.
- Quand le lysozyme agit sur des bactéries qui ont déjà été traitées par la trypsine, il y a augmentation de la concentration agglutinante minimale de P II. Dans ce cas, sans doute, l'arrachement préalable de composés protidiques par l'enzyme est venu faciliter, au cours du second temps, l'action du lysozyme sur le mucopéptide.
- Quand des *Proteus morganii* ont été traités d'abord par la trypsine puis par le chlorure de calcium, la concentration maximale nécessaire de P II pour produire leur agglutination est augmentée : autrement dit, il y a élargissement de la zone d'agglutination (par augmentation de l'état d'hydrophilie).

SECOND CAS : *Le second traitement appliqué a diminué, ou même complètement inhibé, l'action du premier.*

Le cas le plus typique que nous avons observé est celui qui fut offert par le *Proteus morganii* traité d'abord par la trypsine puis par le polypeptide P II. Le germe en question n'était plus agglutinable par le P II. Quelle explication donner ? On pourrait au moins penser que l'abaissement de la charge électrique provoqué par le traitement primaire a été compensé par l'inversion de charge due au traitement secondaire. D'où, ultérieurement, pas d'agglutination possible sous l'effet du P II.

TROISIEME CAS : *Le premier traitement appliqué a renforcé l'action normale du second.*

Exemples :

- Cas des *Salmonella typhimurium* traitées d'abord par le chlorure de calcium puis par la trypsine. Normalement la trypsine, appliquée seule, diminue l'étendue de la zone où *Salmonella typhimurium* se trouve normalement agglutinée par une solution de P II. Cette zone devient encore plus réduite quand la trypsine est appliquée sur des *Salmonella typhimurium* traitées par le chlorure de calcium.
- Cas des *Proteus morganii* traités par le chlorure de calcium puis par la trypsine. Observation analogue à la précédente mais d'expression inverse. Ce que l'on note, cette fois, c'est un élargissement de la zone d'agglutination. Cette zone avait déjà été élargie par rapport à la normale par le chlorure de calcium ajouté seul. Elle devient encore plus large quand, à l'action du chlorure, est venue se superposer l'action de la trypsine, l'élargissement se produisant vers les concentrations les plus faibles (et cela, selon toute probabilité, par diminution de la charge électrique).

QUATRIEME CAS : *Le premier traitement appliqué a empêché l'action normale du second.*

Exemples :

- Quand le staphylocoque TIN ou la *Salmonella typhimurium* ont été traités, d'abord par le chlorure de calcium puis par le P II. Ce que l'on observe alors c'est l'apparition d'une zone d'agglutination (par le P II) identique à celle que l'on obtient pour des germes qui n'ont jamais été traités. Explication ? Nous proposons la suivante : le chlorure de calcium a mis en liberté des substances appartenant à la surface bactérienne et normalement moins hydrophiles que les autres constituants. Il y aurait, en ce cas, augmentation relative de l'hydrophilie, cette augmentation ayant tendance à diminuer l'effet du P II.

- Cas des *Proteus morganii* traités d'abord par le lysozyme, puis par la trypsine. Il se caractérise par le fait que la trypsine n'exerce plus son effet habituel. On voit à cela deux explications possibles :
 - Ou bien, le lysozyme, en se fixant sur la bactérie comme polypeptide cationique, a protégé les fractions protidiques de la surface contre l'action protéolytique ultérieure de la trypsine ;
 - Ou bien, l'augmentation de charge due à l'action enzymatique du lysozyme a été si importante qu'elle n'a pu être compensée ultérieurement par l'abaissement normal entraîné par la trypsine puis par le P II.

CINQUIÈME CAS : *Le premier traitement est demeuré sans action, mais il a permis au second d'exercer une action inaccoutumée.*

Exemple :

Cas du staphylocoque TIN traité par la trypsine puis par le chlorure de calcium. Ce que l'on note ici, c'est une zone d'agglutination par P II plus courte que celle que l'on observe après un traitement simple par le chlorure. Explication : L'action dissociante du sel aurait été rendue plus aisée par l'enlèvement — dû à la trypsine — de diverses substances protidiques présentes dans la surface bactérienne.

SIXIÈME CAS : *Les deux traitements, ajoutés, n'ont produit aucun effet.*

Ici, deux exemples nets à citer :

- Staphylocoques TIN traités à deux reprises par le chlorure de calcium.
- *Proteus morganii* traités par le P II puis par le lysozyme.

Explication : Le staphylocoque TIN serait un germe insensible à l'action du chlorure de calcium. Dans le second cas, le *Proteus morganii* aurait été protégé contre le lysozyme (produit auquel il est pourtant assez sensible) par la pellicule de polypeptide P II qui, au cours du premier traitement, était venue le recouvrir.

TROISIÈME PARTIE

MODIFICATIONS APPORTÉES AU POUVOIR PATHOGÈNE
DE DIFFÉRENTS GERMES
PAR UN TRAITEMENT CHIMIQUE PRÉALABLE

TROISIÈME PARTIE

MODIFICATIONS APPORTÉES AU POUVOIR PATHOGÈNE DE DIFFÉRENTS GERMES PAR UN TRAITEMENT CHIMIQUE PRÉALABLE

INTRODUCTION

Nous avons pu voir, tout au long de la seconde partie de ce travail, que le polypeptide P II, et, aussi, le lysozyme, la trypsine et le chlorure de calcium, sont capables, *in vitro*, de modifier la *morphologie* de diverses bactéries, de modifier également leur *métabolisme respiratoire*, leur *pouvoir antigénique*, leur *sensibilité à la phagocytose*, etc.

Un dernier point — mais un point capital — restait à établir : les mêmes substances pouvaient-elles également entraîner des modifications de la virulence bactérienne ? Pour pouvoir apporter, cette fois encore, une réponse satisfaisante, nous avons fait, parallèlement à nos expériences *in vitro*, un grand nombre d'expériences *in vivo*. Ce sont les résultats de celles-ci qu'il nous faut maintenant présenter.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

A. — Matériel :

1. — *Les animaux* : Nous avons utilisé des souris mâles, albinos, pesant de dix-huit à vingt g. et fournies par le Service des Animaux de l'Institut Pasteur (Responsable : M. LACASSAGNE). Dès leur arrivée dans le service, les souris étaient pesées et examinées. Tous les animaux dont le poids était supérieur à 20 g, et aussi bien ceux qui ne semblaient pas en excellent état, étaient éliminés. Les souris retenues furent réparties par lots de dix dans des cages métalliques contenant une litière de copeaux. Ces cages, avec leurs copeaux, avaient été, au préa-

lable, stérilisées au four Pasteur à 180° pendant trente minutes. Les animaux étaient nourris avec des biscuits spéciaux pour souris de la Maison CAUSSE et de l'eau. Ils étaient gardés au moins huit jours avant toute expérience, les cages contenant ces animaux étant changées au quatrième jour. La veille de l'expérience, les souris étaient à nouveau pesées et examinées. En suivant strictement cette méthode, la mortalité observée chez les témoins a été inférieure à 0,5 %.

2. — *Les suspensions de germes* : Nous avons utilisé, ici, nos trois germes habituels : staphylocoque TIN, *Salmonella typhimurium*, *Proteus morganii*, mais les uns étaient normaux, les autres avaient été traités au préalable.

a) — *Germes normaux* : Les germes fournis par une culture de vingt-quatre heures sur gélose étaient lavés plusieurs fois par de l'eau physiologique. Après la dernière centrifugation, le culot était remis en suspension dans de l'eau physiologique, cela de façon à obtenir une concentration en germes égale à la dose L 50, soit :

Staphylocoques TIN		125	$\times 10^5$	germes par ml
<i>Salmonella typhimurium</i> ..		12,5	$\times 10^5$	germes par ml
<i>Proteus morganii</i>		6,25	$\times 10^5$	germes par ml

b) — *Germes traités* :

— *Traitement simple* : Des germes normaux, en suspension dans de l'eau physiologique, étaient maintenus en contact avec différentes substances (P II, trypsine, lysozyme, chlorure de calcium. Concentration finale de ces produits dans le milieu : P II, trypsine, lysozyme : 1 mg par ml ; chlorure de calcium : M/2), dans un bain-marie agité, à 37°, pendant une heure. Cela fait, les germes étaient centrifugés et lavés et le dernier culot était remis en suspension dans une quantité d'eau physiologique suffisante pour obtenir, en ce cas encore, une concentration en germes égale à la dose L 50 (voir paragraphe ci-dessus).

— *Traitement double* : Un traitement simple comme ci-dessus était d'abord appliqué puis, après lavages, les germes étaient de nouveau maintenus en contact avec l'une ou l'autre de nos substances utilisées à la même concentration que pour le traitement primaire. Ils étaient ensuite lavés et remis en suspension [concentration en germes égale à la dose L 50 (voir a)].

B. — Infection chez l'animal :

Toutes les manipulations ont été exécutées stérilement.

Les injections sur animal ont eu lieu par voie intrapéritonéale et sous le volume de 0,5 ml.

Pour les germes qui avaient été soumis à un traitement simple, chaque série d'expériences comportait 150 souris (50 souris par germe) ;

10 souris recevaient les germes témoins (non traités).

10 souris recevaient les germes traités par P II.

10 souris recevaient les germes traités par le chlorure de calcium.

10 souris recevaient les germes traités par la trypsine.

10 souris enfin recevaient les germes traités par le lysozyme.

Au total, 10 séries d'expériences ont été faites.

Pour les germes qui avaient été soumis à un traitement simple, un même processus qui fut appliqué. Seulement, il n'y eut, au total, que 5 séries d'expériences.

Avant l'injection aux animaux, un échantillon des différentes suspensions microbiennes étaitensemencé (après dilution convenable) sur boîtes de PETRI. Ces boîtes étaient déposées à 37°, pendant vingt-quatre heures. Au sortir de l'étuve, le nombre de colonies était déterminé.

C. — Résultats :

Ils sont exposés sous forme de tableaux. Sont reportés dans ces tableaux :

— Le pourcentage des animaux injectés par des germes traités, et morts après quatre jours ;

— Le rapport entre ce pourcentage et celui observé chez les animaux (témoins) ayant reçu des germes normaux (également après quatre jours).

En ce qui concerne les traitements doubles, comme pour la seconde partie de ce travail (expériences *in vitro*), deux témoins ont été pris en considération :

T : injection de germes non traités,

t : injection de germes ayant subi le traitement primaire.

— Le nombre de colonies présentes sur les boîtes de PETRI. Moyenne de trois dilutions.

1. — *Observations faites avec le staphylocoque TIN :*a) — *Germes soumis à un traitement simple :*

TABLEAU N° 40

Nature des substances ayant servi au traitement des germes	A	B	C
P II	32 %	— 24 %	99
Chlorure de calcium	6 %	— 50 %	101
Trypsine	46 %	— 10 %	98
Lysozyme	64 %	+ 8 %	96

Légende du tableau n° 40 :

A = Pourcentages de mortalité obtenus chez l'animal recevant des germes traités au préalable.

B = Rapports entre les pourcentages obtenus en A et celui obtenu par injection de germes non traités : témoin = 56 %.

C = Nombre de colonies comptées sur boîtes de PETRIensemencées avec les différents germes mis en expérience.

b) — *Staphylocoques TIN soumis à un double traitement :*

TABEAU N° 41

Nature de la substance ayant servi au traitement primaire	P II				Chlorure de calcium				Trypsine				Lysozyme			
	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
P II	12 %	— 46 %	— 26 %	97	6 %	— 52 %	— 4 %	102	28 %	— 30 %	— 24 %	—	—	— 4 %	— 6 %	96
Chlorure de calcium	0 %	— 58 %	— 38 %	100	6 %	— 52 %	— 4 %	100	10 %	— 48 %	— 42 %	100	48 %	— 10 %	— 20 %	98
Trypsine	44 %	— 14 %	+ 6 %	97	42 %	— 16 %	+ 32 %	97	46 %	— 12 %	— 6 %	—	—	— 2 %	— 12 %	102
Lysozyme	64 %	+ 6 %	+ 26 %	98	58 %	0	+ 48 %	100	62 %	+ 4 %	+ 10 %	—	—	+ 32 %	+ 22 %	96
Eau physiologique témoin t (*)	38 %	— 20 %	—	99	10 %	— 48 %	—	102	52 %	— 6 %	—	—	—	+ 10 %	—	99

Légende du tableau n° 41 :

A = Pourcentages de mortalité obtenus chez l'animal recevant des germes traités au préalable.

B = Rapports entre les pourcentages obtenus en A et celui obtenu par injection de germes non traités, c'est-à-dire témoin T = 58 %.

C = Rapports entre les pourcentages obtenus en A et ceux obtenus après traitement primaire des germes, c'est-à-dire témoins t (*).

D = Nombre de colonies comptées sur boîtes de PETRI ensemencées avec les différents germes mis en expérience.

2. — *Observations faites avec la Salmonella typhimurium :*a) — *Germes soumis à un traitement simple :*

TABLEAU N° 42

Nature des substances ayant servi au traitement des germes	A	B	C
P II	50 %	— 15 %	102
Chlorure de calcium	22 %	— 43 %	106
Trypsine	58 %	— 7 %	102
Lysozyme	76 %	+ 11 %	103

Légende du tableau n° 42 :

A = Pourcentages de mortalité obtenus chez l'animal recevant des germes traités au préalable.

B = Rapports entre les pourcentages obtenus en A et celui obtenu par injection de germes non traités : témoin = 65 %.

C = Nombre de colonies comptées sur boîtes de PETRIensemencées avec les différents germes mis en expérience.

b) — *Salmonella typhimurium* soumises à un double traitement :

TABLEAU N° 43

Nature de la substance ayant servi au traitement Nature de la substance ayant servi au traitement primaire secondaire des germes	P II				Chlorure de calcium				Trypsine				Lysozyme			
	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
P II	28 %	— 38 %	— 24 %	105	0 %	— 66 %	— 22 %	104	22 %	— 44 %	— 30 %	102	60 %	— 6 %	— 24 %	102
Chlorure de calcium	6 %	— 60 %	— 46 %	98	8 %	— 58 %	— 14 %	105	0 %	— 66 %	— 52 %	104	70 %	+ 4 %	— 14 %	102
Trypsine	50 %	— 16 %	— 2 %	102	44 %	— 22 %	+ 22 %	102	48 %	— 18 %	— 4 %	101	68 %	+ 2 %	— 16 %	96
Lysozyme	58 %	— 8 %	+ 6 %	103	64 %	— 4 %	+ 42 %	100	66 %	0 %	+ 14 %	102	86 %	+ 20 %	+ 2 %	100
Eau physiologique	52 %	— 14 %		102	22 %	— 44 %		105	52 %	— 14 %		97	84 %	+ 18 %		104
témoin t (*)																

Légende du tableau n° 43 :

- A = Pourcentages de mortalité obtenus chez l'animal recevant des germes traités au préalable.
 B = Rapports entre les pourcentages obtenus en A et celui obtenu par injection de germes non traités, c'est-à-dire témoin T = 66 %.
 C = Rapports entre les pourcentages obtenus en A et ceux obtenus après traitement primaire des germes, c'est-à-dire témoins t (*).
 D = Nombre de colonies comptées sur boîtes de PETRI ensemencées avec les différents germes mis en expérience.

3. — *Observations faites avec le Proteus morganii* :a) — *Germes soumis à un traitement simple* :

TABLEAU N° 44

Nature des substances ayant servi au traitement des germes	A	B	C
P II	38 %	— 36 %	72
Chlorure de calcium	10 %	— 64 %	80
Trypsine	70 %	— 4 %	77
Lysozyme	90 %	+ 16 %	65

Légende du tableau n° 44 :

A = Pourcentages de mortalité obtenus chez l'animal recevant des germes traités au préalable.

B = Rapports entre les pourcentages obtenus en A et celui obtenu par injection de germes non traités : témoin = 74 %.

C = Nombre de colonies comptées sur boîtes de PETRI ensemencées avec les différents germes mis en expérience.

b) — *Proteus morganii* soumis à un double traitement :

TABLEAU N° 45

Nature de la substance ayant servi au traitement primaire de la substance ayant servi au traitement secondaire des germes	P II				Chlorure de calcium				Trypsine				Lysozyme			
	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
P II	28 %	— 46 %	— 16 %	72	12 %	— 62 %	+ 2 %	67	36 %	— 38 %	— 32 %	72	42 %	— 32 %	— 46 %	64
Chlorure de calcium	6 %	— 68 %	— 38 %	66	2 %	— 72 %	— 10 %	64	0 %	— 74 %	— 68 %	70	8 %	— 66 %	— 80 %	65
Trypsine	40 %	— 34 %	— 4 %	69	58 %	— 16 %	+ 48 %	65	52 %	— 22 %	— 16 %	68	72 %	— 2 %	— 16 %	64
Lysozyme	88 %	+ 14 %	+ 44 %	73	76 %	+ 2 %	+ 66 %	64	90 %	+ 16 %	+ 22 %	72	92 %	+ 18 %	+ 4 %	70
Eau physiologique témoin t (*)	44 %	— 30 %	—	64	10 %	— 64 %	—	71	68 %	— 6 %	—	70	88 %	+ 14 %	—	67

Légende du tableau n° 45 :

- A = Pourcentages de mortalité obtenus chez l'animal recevant des germes traités au préalable.
 B = Rapports entre les pourcentages obtenus en A et celui obtenu par injection de germes non traités, c'est-à-dire témoin T = 74 %.
 C = Rapports entre les pourcentages obtenus en A et ceux obtenus après traitement primaire des germes, c'est-à-dire témoins t (*).
 D = Nombre de colonies comptées sur boîtes de PETRI ensemencées avec les différents germes mis en expérience.

La lecture des tableaux précédents apprend les faits suivants :

1. — *Germes ayant été soumis à un seul traitement :*

- a) — *Le traitement simple par le chlorure de calcium* a diminué fortement le pouvoir pathogène des trois germes. Plus précisément dit, il l'a diminué :

de 50 % pour le staphylocoque TIN,
de 43 % pour la *Salmonella typhimurium*,
de 64 % pour le *Proteus morganii*.

- b) — *Le traitement simple par le P II* a diminué, lui aussi, le pouvoir pathogène des trois germes :

de 24 % pour le staphylocoque TIN,
de 15 % pour la *Salmonella typhimurium*,
de 36 % pour le *Proteus morganii*.

- c) — Une même action a été observée mais comparativement beaucoup plus faible après *traitement simple par la trypsine*. Le pouvoir pathogène des trois germes a été diminué en ce cas :

de 10 % pour le staphylocoque TIN,
de 7 % pour la *Salmonella typhimurium*,
de 4 % pour le *Proteus morganii*.

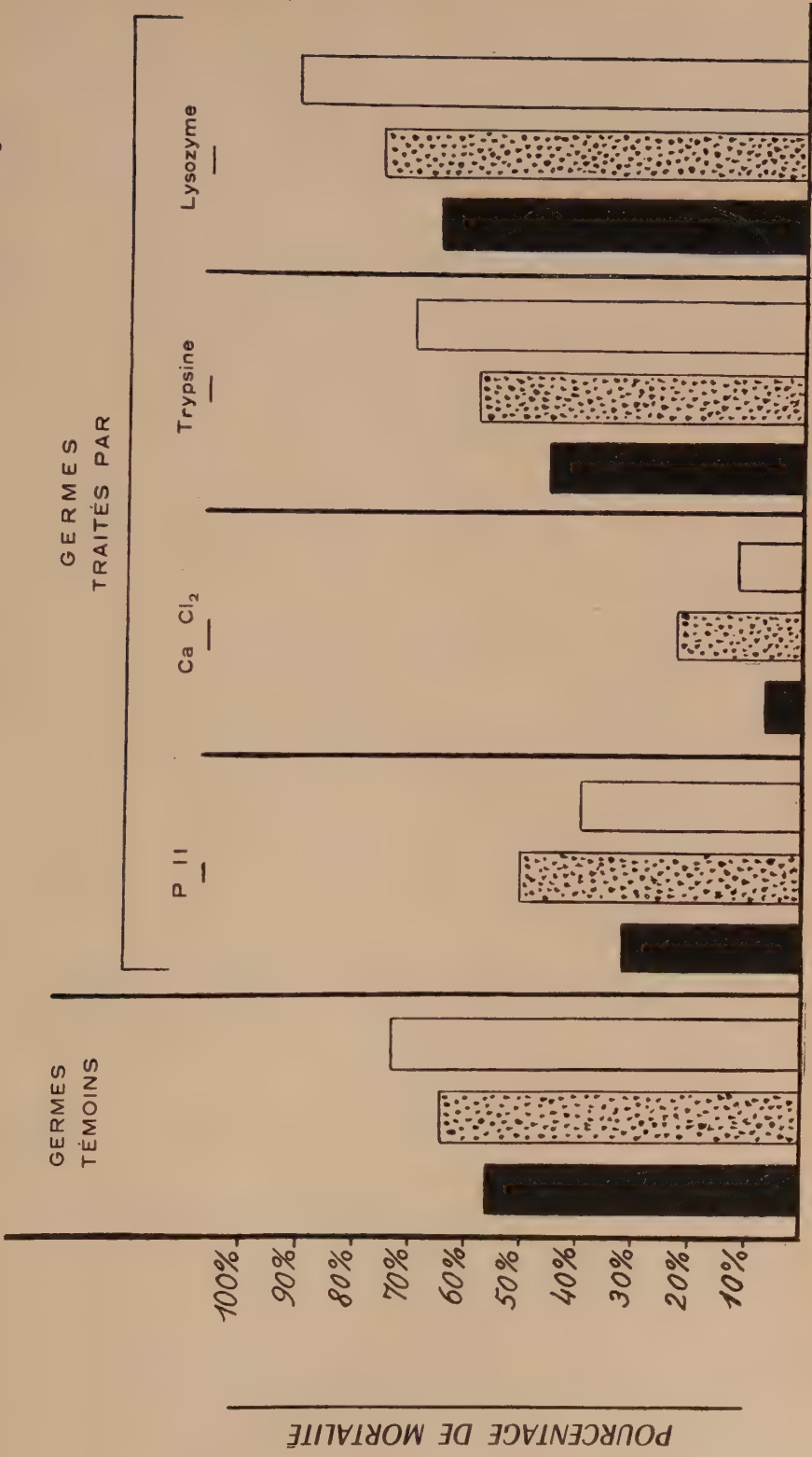
- d) — A l'opposé, un *traitement simple par le lysozyme* s'est montré capable d'augmenter le pouvoir pathogène des trois germes :

de 8 % pour le staphylocoque TIN,
de 11 % pour la *Salmonella typhimurium*,
de 16 % pour le *Proteus morganii*.

Tous ces résultats sont résumés dans l'histogramme n° 1.

HISTOGRAMME N° 1

- Staphylocoques
- Salmonella typhimurium
- Proteus morganii



2. — Germes ayant été soumis à un double traitement :

a) — Germes traités d'abord par P II :

- Un traitement secondaire, soit par P II, soit par le chlorure de calcium s'est montré capable de diminuer le pouvoir pathogène des trois germes par rapport à ce qu'il était chez les témoins T et t.
- Un traitement secondaire par la trypsine n'a eu comparativement que peu d'effet. Il a augmenté légèrement le pouvoir pathogène du staphylocoque TIN. Il a diminué légèrement celui de la *Salmonella typhimurium* et du *Proteus morganii* par rapport à ce qu'il était chez le témoin t. Egalement diminution importante du pouvoir pathogène des trois germes par rapport à celui observé chez le témoin T.
- Un traitement secondaire par le lysozyme a augmenté, dans tous les cas, le pouvoir pathogène des trois germes par rapport à t. Par rapport à T, il y a eu augmentation du pouvoir pathogène du staphylocoque TIN et de *Proteus morganii*, diminution légère de celui de la *Salmonella typhimurium*.

b) — Germes traités d'abord par le chlorure de calcium :

- Un traitement secondaire par P II ou par le chlorure de calcium est demeuré pratiquement sans action par rapport à t. Il y a eu diminution très importante du pouvoir pathogène des trois germes par rapport à T.
- Un traitement secondaire par la trypsine a augmenté, dans tous les cas, le pouvoir pathogène des trois germes par rapport à t. Cependant, par rapport à T, le pouvoir pathogène des trois germes est encore demeuré au-dessous de la normale.
- C'est un même effet qui a été produit, par rapport à t, par un traitement secondaire par le lysozyme. Très peu de différence par rapport à T.

c) — Germes traités d'abord par la trypsine :

- Un traitement secondaire par P II, le chlorure de calcium ou la trypsine a diminué le pouvoir pathogène des trois germes en expérience par rapport à T et t.
- Un traitement secondaire par le lysozyme a produit exactement, sur ces trois germes en expérience par rapport à T et t, l'effet contraire.

d) — *Germes traités d'abord par le lysozyme :*

- *Un traitement secondaire par le P II, le chlorure de calcium ou la trypsine a diminué le pouvoir pathogène du staphylocoque TIN et du Proteus morganii par rapport à T et t, et de la Salmonella typhimurium par rapport à t. Il est resté pratiquement sans action sur le pouvoir pathogène des Salmonella typhimurium par rapport à T.*
- *Un traitement secondaire par le lysozyme a, dans tous les cas, augmenté le pouvoir pathogène des trois germes par rapport à T et t.*

*
**

A la suite des travaux poursuivis sur les effets antibactériens exercés *in vitro* par cette fraction polypeptidique extraite du thymus de veau que nous appelons P II, travaux qui, rappelons-le, ont préludé à ceux rapportés dans cette thèse, nous avons pensé à étudier l'effet de la dite fraction sur le pouvoir pathogène de différents germes (33, 34, 90). Ce que nous avons pu noter alors, c'était un effet proinfectieux très net, la substance étant introduite, chez l'animal, par voie intrapéritonéale, soit en mélange avec les germes, soit une heure avant l'injection de ceux-ci.

Or, les nouveaux résultats que nous venons de présenter indiquent, eux, un effet exactement contraire. Comment pouvait-on rendre compte de cette discordance ? Nous avons pensé à l'explication suivante : Dans le premier cas (e.g. premiers travaux), la substance était allée toucher la résistance même de l'hôte. Dans le second, au contraire (e.g. nouveaux résultats) ce sont les germes eux-mêmes qui ont été atteints.

Mais que valait cette explication ? On ne pouvait répondre qu'après mise en route de nouvelles expériences. Ce que nous avons fait.

Au cours de celles-ci, nous avons injecté, à des souris, par voie intrapéritonéale, une solution de P II à la dose naguère utilisée par nous (soit 2 mg par ml), puis une heure plus tard, nous avons, également par voie intrapéritonéale, injecté chez les animaux des germes normaux ou ayant été soumis, au préalable, à un traitement simple par les différentes substances étudiées.

Le matériel d'étude et les techniques utilisées ont été, en tous points, semblables à ceux rapportés au début de ce chapitre.

Résultats :

Ils sont exprimés, une fois encore, sous forme de tableaux.
 Dans ces tableaux on trouvera :

- Les pourcentages des animaux morts après quatre jours ;
- Les rapports entre ces pourcentages et ceux observés chez les témoins (T = souris n'ayant pas reçu de P II et traitées par des germes normaux ; t = souris ayant reçu une injection de P II une heure avant d'être traitées par des germes normaux).

1. — *Observations faites avec le staphylocoque TIN :*

TABLEAU N° 46

Nature des substances ayant servi au traitement des germes	A	B	C
P II	82 %	+ 24 %	— 8 %
Chlorure de calcium	76 %	+ 18 %	— 14 %
Trypsine	84 %	+ 26 %	— 6 %
Lysozyme	100 %	+ 42 %	— 10 %

Légende du tableau n° 46 :

- A = Pourcentages de mortalité obtenus chez l'animal recevant des germes traités au préalable.
- B = Rapports entre les pourcentages obtenus en A et celui obtenu par injection de germes non traités, sans injection préalable de P II, c'est-à-dire témoin T = 58 %.
- C = Rapports entre les pourcentages obtenus en A et celui obtenu par injection de germes non traités, après injection préalable de P II, c'est-à-dire témoin t = 90 %.

2. — Observations faites avec la *Salmonella typhimurium* :

TABLEAU N° 47

Nature des substances ayant servi au traitement des germes	A	B	C
P II	88 %	+ 16 %	— 12 %
Chlorure de calcium	84 %	+ 12 %	— 16 %
Trypsine	100 %	+ 28 %	0 %
Lysozyme	100 %	+ 28 %	0 %

Légende du tableau n° 47 :

A = Pourcentages de mortalité obtenus chez l'animal recevant des germes traités au préalable.

B = Rapports entre les pourcentages obtenus en A et celui obtenu par injection de germes non traités, sans injection préalable de P II, c'est-à-dire témoin T = 72 %.

C = Rapports entre les pourcentages obtenus en A et celui obtenu par injection de germes non traités, après injection préalable de P II, c'est-à-dire témoin t = 100 %.

3. — Observations faites avec le *Proteus morganii* :

TABLEAU N° 48

Nature des substances ayant servi au traitement des germes	A	B	C
P II	90 %	+ 22 %	— 10 %
Chlorure de calcium	86 %	+ 18 %	— 14 %
Trypsine	100 %	+ 32 %	0 %
Lysozyme	100 %	+ 32 %	0 %

Légende du tableau n° 48 :

A = Pourcentages de mortalité obtenus chez l'animal recevant des germes traités au préalable.

B = Rapports entre les pourcentages obtenus en A et celui obtenu par injection de germes non traités, sans injection préalable de P II, c'est-à-dire témoin T = 68 %.

C = Rapports entre les pourcentages obtenus en A et celui obtenu par injection de germes non traités, après injection préalable de P II, c'est-à-dire témoin t = 100 %.

La lecture de ces tableaux apprend les faits suivants :

1. — *Des germes normaux, injectés chez la souris une heure après la solution de P II, ont un pouvoir pathogène anormalement haut.* Se trouvent donc confirmés les résultats que nous avons antérieurement trouvés et qui révélaient qu'une injection de P II peut exercer, chez l'animal, une action proinfectieuse.
2. — *Le pouvoir proinfectieux d'une injection préalable de P II se manifeste encore quand sont mis en expérience, non plus des germes normaux, mais des germes d'abord traités par la trypsine ou le lysozyme.*
3. — *En revanche, il se fait à peine sentir, quand les germes utilisés ont été traités, au préalable, par le P II ou le chlorure de calcium.*

DISCUSSION

Nous ferons d'abord un bref résumé de nos résultats. Dans un second temps, nous ferons état de quelques observations publiées par d'autres auteurs qui ne sont pas sans intérêt pour nous. Nous essaierons enfin de déterminer la portée de nos propres résultats.

1. — *Résumé des principaux faits observés :*

- a) — Quand le staphylocoque TIN, la *Salmonella typhimurium* et le *Proteus morganii* ont subi l'effet d'un traitement simple par le P II, le chlorure de calcium ou la trypsine, ils restent vivants, mais leur pouvoir pathogène est diminué. Le même pouvoir, en revanche, peut être augmenté après traitement des bactéries par le lysozyme.

b) — *Observations faites après double traitement :*

- Des germes soumis à un traitement secondaire par le lysozyme ont un pouvoir pathogène augmenté, quelle qu'ait été la nature de la substance qui a servi au traitement primaire.
- Un traitement secondaire par la trypsine tend à neutraliser l'effet d'un traitement primaire par le chlorure de calcium.

En effet, les germes traités dans un premier temps par ce corps et qui, par conséquent avaient un pouvoir pathogène diminué, voient celui-ci augmenter

quand ils sont secondairement traités par la trypsine (ce qui est remarquable, attendu que les germes soumis à un traitement simple par la trypsine ont, eux, un pouvoir pathogène diminué).

— Le P II, le chlorure de calcium et la trypsine sont en mesure de neutraliser pareillement l'effet du lysozyme. En effet, des germes d'abord traités par le lysozyme, qui, par conséquent, ont un pouvoir pathogène augmenté, voient ce pouvoir diminuer quand ils ont été soumis secondairement à l'action du P II, du chlorure de calcium ou de la trypsine.

c) — L'injection préalable d'une solution de P II, chez la souris, augmente la sensibilité de cet animal à l'action de germes normaux ou de germes traités par la trypsine ou le lysozyme.

Les germes traités par le P II ou le chlorure de calcium, quand ils sont injectés une heure après une solution de P II ont un pouvoir pathogène diminué; toutefois, ce pouvoir est encore supérieur à celui exercé, dans les mêmes conditions, par des germes normaux.

2. — Sur quelques résultats obtenus par d'autres auteurs :

Deux points mériteraient d'être considérés ici :

— Pour quelle raison, une injection de polypeptide P II peut-elle augmenter la sensibilité de la souris à des germes normaux (ou traités) ?

— Pour quelle raison, le pouvoir pathogène de germes vivants mais traités d'abord par telle ou telle substance chimique peut-il être modifié ?

Après réflexion, nous avons pensé qu'il n'était pas nécessaire d'apporter, dans cette thèse, une réponse à la première question, car le problème en cause déborde de trop loin notre véritable sujet. Nous considérerons donc simplement la seconde question.

a) — *Résultats obtenus avec des substances semblables à celles que nous avons utilisées :*

— *Chlorure de calcium :* En 1930, J. BORDET et E. RENAUX (14), étudiant l'influence du calcium sur le *Bacillus anthracis*, ont observé qu'après culture sur gélose oxalatée, les spores conservaient leur virulence mais qu'elles la perdaient après culture sur de la gélose calcifiée. Un peu plus tard, en 1941, les mêmes auteurs (13), étudiant cette fois *Escheri-*

chia coli et le bacille d'AERTRYCKE, ont remarqué que le bouillon calcifié favorise la croissance des formes *rough* aux dépens des formes *smooth*, que le bouillon oxalaté, au contraire, favorise la croissance des formes *smooth* aux dépens des formes *rough*. Le strontium et le baryum auraient, en ce cas, le même effet que le calcium.

En 1955, E.-A. MEYER et M. MOSKOWITZ (74), étudiant le pouvoir pathogène de *Clostridium perfringens*, avaient eu l'occasion d'injecter à des souris le dernier culot d'une suspension bactérienne lavée deux fois par de l'eau physiologique puis repris par du chlorure de calcium à 5 %. Ils ont dit n'avoir n'avoir obtenu, dans ces conditions, aucune modification du pouvoir pathogène des germes.

- *Lysozyme* : A. MELSON et R. WEISER, en 1958 (73), ayant traité à 37°, sur une durée de une à huit heures, des pneumocoques par du lysozyme, n'ont eu à constater aucune modification de la virulence bactérienne.

b) — *Résultats obtenus avec des substances différentes de celles que nous avons utilisées :*

Naturellement, ici, nous devons exclure toutes les observations recueillies au cours de recherches sur les antibiotiques.

- *Substances reconnues comme étant capables d'augmenter le pouvoir pathogène :*

- *Substances chimiques* : Parmi celles-ci, la plus importante est assurément la *mucine*. Depuis la découverte de son action proinfectieuse par W.-F. NUNGESTER, A.-A. WOLF et L.-F. JOURDONAIS, en 1932 (84), elle a donné lieu à de très nombreux travaux.

En 1948, L. OLITZKI (85), dans une revue générale où il analysait les publications se rapportant à l'action proinfectieuse de la mucine, a émis l'hypothèse que celle-ci pourrait agir sur le germe par un effet de « couverture ». Effectivement ce mécanisme aurait été de nature à expliquer la production de nombreux phénomènes observés tels que :

- L'inhibition de la formation des anticorps ;
- L'action anticomplémentaire ;

- L'inhibition de l'apparition de leucocytes dans la cavité péritonéale (limitée à une heure après l'injection de mucine) ;
- L'inhibition de la digestion phagocytaire.

C'est-à-dire autant de faits qui peuvent être observés après injection aux animaux de germes « recouverts » de mucine.

Un peu plus tard, de 1950 à 1953, H. SMITH et coll., étaient conduits à publier, dans une série d'articles (101 à 109) les résultats de leurs travaux sur la nature chimique de la substance ou des substances actives que l'on peut extraire de la mucine. A leur avis, l'activité proinfectieuse de la mucine gastrique de porc reposerait sur l'intervention associée d'un *milieu visqueux*, d'un *résidu* et d'un « *troisième facteur* ». Ce dernier se composerait lui-même d'une *héparine hautement active*, d'un *acide chondroïtine sulfurique* et de différents principes analogues à ceux responsables des groupes sanguins. Ces derniers expliqueraient, au moins en partie, la viscosité du milieu.

En 1949, C. SANDAGE et C.-K. STARK (94), alors qu'ils discutaient les conclusions de L. OLITZKI sur le mécanisme d'action possible de la mucine (à savoir l'effet de « couverture » sur les germes), ont admis que la substance agissait plutôt de façon indirecte en augmentant la perméabilité capillaire.

Etudiant l'action de l' α tocophérol sur le pouvoir proinfectieux de la mucine, S.-S. ELBERG et D. GALE, en 1949 (41), puis en 1952 (51), ont publié les conclusions suivantes :

Une injection préliminaire sous-cutanée ou intrapéritonéale de mucine protège l'animal contre l'infection produite par injection de *S. typhi* en suspension dans la mucine ;

Une injection préliminaire intrapéritonéale d' α tocophérol protège également l'animal.

Ils ont attribué, eux aussi, cette action à un effet spécifique de l' α tocophérol sur la perméabilité capillaire.

En 1953, H.-P. LANBERT et coll. (69), reprenant les travaux de S.-S. ELBERG et D. GALE, ont été à même de préciser que la protection dont nous venons de parler pouvait également être mise en évidence après injection d'un grand nombre de produits divers et qu'elle traduisait un effet non spécifique.

Parmi les autres substances encore étudiées, nous citons les suivantes :

Agents mouillants :

En 1957, D. ALMEIDA DE CHRISTOVAO (2), étudiant l'action de deux agents mouillants : le Deceresol et le Duponol sur diverses souches d'*Enterobacteriaceae* : *Sh. dysenteriae*, *Sh. paradysenteriae*, *S. typhosa* et *Sh. ambigua*, a remarqué que le pouvoir pathogène de ces germes était augmenté quand ceux-ci étaient injectés en mélange avec les produits sus-nommés.

Un composé polymérisé synthétique de lysine (polylysine) :

D.-J. BUCHANAN-DAVIDSON et coll. (18), ayant étudié, en 1960, l'action de la polylysine sur le pouvoir pathogène de quelques germes, ont eu à noter les faits suivants :

- Augmentation du pouvoir pathogène des *Salmonella typhimurium* injectées avec la polylysine ;
- Aucun effet de cette substance sur le pouvoir pathogène des *streptocoques* groupe C ;
- Diminution du pouvoir pathogène des pneumocoques types, I, II, III, injectés, chez des souris, par voie intrapéritonéale, immédiatement avant l'injection intrapéritonéale de la polylysine. Quand la polylysine et les pneumocoques étaient injectés en deux points différents, la protection ne s'exerçait plus ;
- Aucune action de la polylysine sur les infections cutanées de la souris provoquées par *Staphylococcus aureus*.
- A signaler enfin quelques travaux concernant des *extraits bactériens* : H.-B. LEVINE et coll. (71) avaient extrait, en 1959, une fraction peptidique à partir de *Pseudomonas pseudomallei*. Cette fraction, injectée en même temps que des *Pseudomonas pseudomallei* ou des *Pasteurella pestis*, s'est montrée capable d'augmenter le pouvoir pathogène des germes.

En 1961, S.-J. SILVERMAN et coll. (96) ont recherché l'effet d'un extrait brut de cellules de *Listeria monocytogenes* sur le pouvoir pathogène de nombreux germes tant GRAM positif que GRAM négatif. Le mélange germe-extrait s'est montré plus pathogène que les germes injectés seuls. L'extrait en cause restait actif quand il était injecté avant les germes ou bien en même temps qu'eux, mais par une autre voie.

— *Substances connues comme étant capables de diminuer le pouvoir pathogène :*

En 1958, H.-O. COLLIER JR. (25) avait remarqué que lorsque des *Corynebacterium ovis* sont injectés, par voie intradermique, avec de l'acétate de cortisone, le diamètre des lésions produites reste anormalement petit.

Nous pourrions citer quelques autres exemples, mais déjà éloignés des résultats rapportés ici par nous. Il nous paraît donc inutile de le faire. A tout le moins, en ce domaine, nous pouvons recommander la lecture de deux importantes revues générales. L'une parue en 1961 sous le titre de « Essai d'une interprétation de la virulence et du pouvoir pathogène ». Dans cette revue, P. LALLOUETTE et G. BOURDERON (68), étudiant successivement le *germe et sa virulence*, *l'animal réactif*, *le pouvoir pathogène*, ont pu, dans chacun de ces cas, mettre en évidence les modifications apportées par différents traitements physiques, chimiques ou biologiques.

L'autre revue est parue en 1962, sous le titre « Le pouvoir pathogène d'une bactérie ou les éléments du conflit hôte-parasite », et est de A. DELAUNAY (26). L'auteur analyse systématiquement les deux forces en présence, leur nature et les modifications que l'on peut apporter à chacune d'elles.

3. — *Portée des résultats enregistrés par nous :*

Nous avons montré dans la seconde partie de cette thèse que le traitement de différents germes par le polypeptide P II, le chlorure de calcium, le lysozyme et la trypsine peut entraîner pour ces germes, et à *des doses qui ne les tuent pas*, des modifications notables de leur morphologie et de leurs propriétés métaboliques. Nous pouvons ajouter maintenant que le même traitement peut aussi *modifier le pouvoir pathogène*.

Il s'agit ici d'une *modification nette*, d'une modification pouvant se faire sentir *dans les deux sens* (e.g. diminution du pouvoir pathogène après traitement par le chlorure de calcium, le polypeptide P II, et la trypsine ; augmentation après traitement par le lysozyme) ; enfin d'une *modification transitoire* car, après de nouvelles cultures *in vitro*, nous avons pu constater que les germes traités retrouvent rapidement leur pouvoir pathogène normal.

Comment expliquer une telle modification du pouvoir pathogène ? Bien évidemment, par suite d'une atteinte des facteurs de virulence présents dans la surface bactérienne, altérée elle-même par les processus dont nous avons largement parlé plus haut.

Mais une question particulière se pose ici : *une atteinte de même ordre pourrait-elle se produire aussi, spontanément, in vivo ?* Rien, en principe, n'empêche de l'admettre... On aurait même beaucoup de raisons de le croire étant donné que les récents travaux de J.-K. SPITZNAGEL (114) apportent des preuves déjà indiscutables d'une intervention, dans l'organisme même, et au titre de facteurs antibactériens, de certains polypeptides basiques.

Néanmoins, dans l'état actuel des choses, il convient de rester prudent.

Trop de particularités échappent encore à notre compréhension. Par exemple :

Comment expliquer avec précision que des germes traités au préalable par P II ont un pouvoir pathogène diminué alors que des germes normaux injectés avec la même substance ont au contraire leur pouvoir pathogène augmenté ?

Comment expliquer que des germes traités par le lysozyme ont un pouvoir pathogène augmenté alors qu'il est admis très généralement que la dite substance est un principe bactéricide assez important ?

Comment expliquer enfin toutes les possibilités que l'on peut constater *in vivo* quand des germes infectieux ont été traités, successivement, par deux substances différentes ?

Mais faut-il vraiment s'étonner d'une telle complexité ? Non. Chacun sait aujourd'hui que de multiples facteurs commandent l'évolution d'un conflit hôte-parasite, les uns étant attachés aux germes de l'infection, les autres concernant l'organisme infecté.

Un conflit hôte-parasite, c'est avant tout la mise en place d'un certain équilibre. Et, à coup sûr, pareil équilibre peut être influencé par bien des causes.

Ce serait courir le risque, une fois de plus, de déborder le cadre de ce travail en partant à la recherche de ces causes.

Ici, avec les expériences *in vivo* que nous avons faites, nous n'avons voulu que poser le problème sous un jour nouveau.

Nous demanderons à nos prochaines recherches d'apporter sur les faits, que nous laissons aujourd'hui obscurs, toutes les clartés souhaitables.

CONCLUSIONS

1. — Quand des germes ont été traités par le polypeptide P II, le chlorure de calcium, le lysozyme et la trypsine, leur pouvoir pathogène apparaît, dans la règle, modifié.

2. — Le plus souvent, cette modification va dans le sens d'une diminution de virulence (ex. : après traitement par le polypeptide P II, le chlorure de calcium et la trypsine). Mais elle peut aller aussi dans le sens d'une augmentation (ex. : après traitement par le lysozyme).
 3. — Des travaux faits antérieurement à ceux publiés dans cette thèse nous avaient appris qu'une injection isolée d'une solution de polypeptide P II peut diminuer la résistance de souris infectées une heure plus tard par des germes normaux. Certaines recherches inédites, exposées dans ce chapitre, nous ont appris que le pouvoir proinfectieux du P II dont nous venons de parler arrive à se manifester encore avec des germes d'abord traités par la trypsine ou le lysozyme. En revanche, il devient extrêmement réduit quand se trouvent en cause des germes d'abord traités par le polypeptide P II, ou le chlorure de calcium.
-

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Le travail que nous venons de présenter était une étude des effets antibactériens que peuvent exercer *in vitro* et *in vivo*, d'une part un *complexe polypeptidique* (que nous avons nommé *P II*) qui a été extrait, par nos soins, du thymus de veau, d'autre part, et à titre comparatif, trois substances diverses : le *chlorure de calcium*, le *lysozyme* et la *trypsine*.

Les effets rapportés ont été nombreux.

RECHERCHES IN VITRO

1. — La plupart des germes, GRAM positif ou GRAM négatif (ex. : staphylocoque TIN, *Salmonella typhimurium*) qui ont été maintenus un certain temps (e.g. : une heure) dans une solution physiologique contenant une concentration suffisante de *P II* (2 mg par ml) se trouvent — tout en restant vivants — modifiés sur le plan morphologique, biochimique et physiologique. Par exemple, ils ne donnent plus de suspensions homogènes quand ils sont portés dans une solution d'eau physiologique (ils restent agglutinés), ils acquièrent ou ils perdent certaines activités enzymatiques, leur métabolisme respiratoire est très perturbé, de même que leur constitution antigénique ; enfin, leur sensibilité à la phagocytose est très augmentée. L'action du *P II* a-t-elle été anormalement prolongée, on peut assister à la mort des germes. Le polypeptide *P II* a donc la valeur d'un agent antibactérien.
2. — Quelques germes, cependant, paraissent en état de résister à cet agent. Au cours de nos recherches, nous avons rencontré l'un d'eux : le *Proteus morganii*.
3. — Comment expliquer, quand elle se manifeste, l'action antibactérienne exercée par le polypeptide *P II* ? Dans notre texte (Ch. VII), nous nous sommes longuement étendue sur cette question. Il nous suffira de dire ici que selon toute vraisem-

blance, elle résulte de la souffrance qu'entraîne, pour la bactérie, la fixation du complexe chimique sur sa paroi. Nous avons dit, également dans le chapitre VII, par quels liens chimiques devait s'établir cette fixation. Nous avons fait l'inventaire des constituants pariétaux qui, en raison de leur structure particulière, peuvent retenir et fixer sur eux le *P II*.

4. — Le *chlorure de calcium*, le *lysozyme* et la *trypsine*, utilisés isolément, manifestent eux-mêmes diverses propriétés antibactériennes. Mais, comparativement, ces propriétés sont beaucoup moins accusées que celles que l'on peut mettre en évidence, au même moment, pour le *polypeptide P II*. Là encore, nous avons essayé de dire comment elles pouvaient s'exercer.
5. — Il était intéressant de savoir si les actions antibactériennes normalement exercées par le *polypeptide P II* se trouvaient modifiées quand les germes en expérience avaient, au préalable, été traités par le chlorure de calcium, le lysozyme ou la trypsine. De même, il était intéressant de savoir si l'action de l'un de ces derniers corps pouvait également être modifiée par un traitement préalable d'un germe, soit par le *P II*, soit par une autre substance. D'où les très nombreuses expériences que nous avons entreprises à ce sujet. Elles ont montré que les traitements préalables avaient des effets divers (dans le sens, parfois, d'une augmentation, parfois, d'une diminution) mais, en règle générale, marqués.

RECHERCHES IN VIVO

Le but de celles-ci était de nous apprendre si les germes qui ont été traités par le *polypeptide P II*, ou encore par le chlorure de calcium, la trypsine ou le lysozyme à des concentrations assez élevées pour altérer leurs propriétés biochimiques et physiologiques, mais assez faibles pour épargner leur vitalité, avaient un *pouvoir pathogène* modifié quand on venait à les injecter chez les souris.

Toutes les expériences ici faites se sont soldées, comme les précédentes, par des résultats nettement positifs, le pouvoir pathogène étant, dans tous les cas, modifié. Mais ce qu'il importe d'ajouter aussitôt, c'est que cette modification ne va pas toujours dans le même sens. Après traitement des germes, en effet, le pouvoir pathogène peut être augmenté (lysozyme) ou diminué (*P II*, chlorure de calcium, trypsine).

Les modifications normalement entraînées par un traitement simple des germes par telle ou telle substance (*P II*, ou lysozyme, ou chlorure

de calcium, ou trypsine) changent souvent d'aspect quand, à ce traitement simple, a été ajouté le traitement par une autre substance.

Nos résultats sont, tous, *originaux*. Quant à leur *intérêt*, il tient, à notre avis, aux raisons suivantes :

1. — Ils ajoutent des faits nouveaux, précis, significatifs, à ceux qui ont été déjà publiés eu égard à l'action antibactérienne d'*antibiotiques internes* comme le *polypeptide P II*. Et, ceci n'est pas sans importance, vu l'intérêt croissant, dont nous parlions dans notre introduction, que l'on attache actuellement, en *Immunologie*, aux substances de ce genre.
 2. — Ils apportent aussi des faits nouveaux dont pourront bénéficier tous les *Bactériologistes* qui s'intéressent aux rapports éventuels que peuvent contracter les constituants de la surface bactérienne avec des cations électro-positifs.
 3. — Enfin, sur le plan de la *Pathologie*, ils contribuent à justifier l'opinion qui veut que des antibiotiques internes comme le *P II*, que des enzymes comme le lysozyme et la trypsine, que des ions comme le calcium, pourraient intervenir, au même titre que les anticorps et les phagocytes, dans l'évolution, heureuse ou fatale, d'un conflit hôte-parasite.
-

BIBLIOGRAPHIE

1. — ALFERT M. et GESCHWIND I.-I. — A selective method for the basic proteins of cell nuclei. *Proc. Nat. Acad. Sc.*, 1953, **39**, 991.
2. — ALMEIDA DE CHRISTOVAO D. — Enhancement of pathogenicity of enterobacteriaceae for mice by wetting agents. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1957, **94**, 724.
3. — AMANO T., SEKI Y., KASHIBA S., FUJIKAWA K. et MORIOKA T. — The effect of leucocytes extract on *staphylococcus pyogenes*. *Med. J. of Osaka Univers.*, 1956, **7**, 233.
4. — ARDOINO L.-A. et MELDOLESI M.-F. — Modificazioni indotte dalle proteine basiche sullo stafilococco aureo. *Giorn. Batter. Immunologia.*, 1958, **51**, 219.
5. — BAZIN S. et ALLIOT-COUADE S. — Etude de la variation de charge électrique du bacille typhique au cours de sa floculation par les acides. *C. R. Soc. Biol.*, 1946, **140**, 178.
6. — BAZIN S. et ALLIOT-COUADE S. — Etude de la vitalité du bacille typhique au cours de sa floculation par les acides. *C. R. Soc. Biol.*, 1946, **140**, 180.
7. — BERNARD J. — Contribution à l'étude de l'action des alcaloïdes sur les bactéries. *Thèse de Doctorat en Pharmacie*. Paris, 1953.
8. — BISSET K.-A. — The morphology and cytology of bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.*, 1951, **5**, 1.
9. — BLOOM W.-L. et BLAKE F.-G. — Studies on an antibacterial polypeptide extracted from normal tissues. *J. Inf. Dis.*, 1948, **83**, 116.
10. — BLOOM W.-L. et PRIGMORE J.-R. — A method for preparation of antibacterial basic proteins of normal tissues. *J. Bact.*, 1952, **64**, 855.
11. — BLOOM W.-L., WINTERS M.-G. et WASTON D.-W. — The inhibition of two antibacterial basic proteins by nucleic acids. *J. Bact.*, 1951, **62**, 7.
12. — BOIVIN A., MESROBEANU I. et MESROBEANU L. — Technique pour la préparation des polysaccharides microbiens spécifiques. *C. R. Soc. Biol.*, 1933, **113**, 490.
13. — BORDET J. et BORDET P. — Le rôle du calcium dans la dissociation microbienne. *Schweizer. Zeitschr. Pathol. u. Bakteriologie*, 1941, **4**, 321.
14. — BORDET J. et RENAUX E. — L'influence du calcium sur l'évolution des cultures de charbon. *Ann. Inst. Pasteur*, 1930, **45**, 1.
15. — BRADFIELD J.-R.-G. — Bacterial anatomy. *6 th. Symposium of the Society for General Microbiology*. University Press, 1956, 303.
16. — BROCK T.-D. — The effect of salmine on bacteria. *Canad. J. Microbiol.*, 1958, **4**, 65.
17. — BUCHANAN-DAVIDSON D.-J., SEASTONE C.-V. et STAHHAMANN M.-A. — Action of synthetic polylysine on the growth and phagocytosis of bacteria *in vitro*. *J. Bact.*, 1960, **80**, 590.
18. — BUCHANAN-DAVIDSON D.-J., STAHHAMANN M.-A. et NEPPER C.-A. — Action of synthetic polylysine on experimental infections in animals. *J. Bact.*, 1960, **80**, 595.
19. — BURGER W.-C. et STAHHAMANN M.-A. — The agglutination and growth inhibition of bacteria by lysine polypeptides. *Arch. Biochem., Biophys.*, 1952, **39**, 27.
20. — CHOUCROUN N. et PLOTZ H. — Différences entre les électrisations de diverses variétés de bacilles tuberculeux. *C. R. Acad. Sc.*, 1934, **199**, 165.
21. — COLOBERT L. — Gonflement de la paroi externe des Salmonelles par l'effet du lysozyme. *C. R. Soc. Biol.*, 1957, **151**, 1553.
22. — COLOBERT L. — Lysozyme et autarcèse. *Path. Biol.*, 1960, **8**, 1025.
23. — COLOBERT L. et LOUISOT P. — Uniformité des altérations morphologiques chez les bactéries soumises à des agressions de types différents. Structure granulaire du cytoplasme bactérien. *Ann. Inst. Pasteur*, 1958, **94**, 463.
24. — COLOBERT L. et SERVANT P. — L'effet du lysozyme sur l'antigène somatique d'*Eberthella typhi*. *Ann. Inst. Pasteur*, 1959, **97**, 549.
25. — COLLIER H.-O. Jr. — Local action of some antibacterial substances against *Corynebacterium ovis* in guinea pig skin. *Brit. J. Pharmacol. Chemother.*, 1958, **13**, 231.

26. — DELAUNAY A. — Le pouvoir pathogène d'une bactérie, ou les éléments du conflit hôte-parasite. Conférence parue dans le *Bull. de l'Acad. Nat. de Chirurgie Dentaire*, 6^e année, n° 6, séance du 26 mars 1962, 15.
27. — DELAUNAY A., HENON M., PELLETIER M. — Nucléoagglutinines sériques. *Rev. Franç. Etudes Clin. et Biol.*, 1958, 3, 58.
28. — DELAUNAY A., HENON M. et PELLETIER M. — Oponines bactériennes non spécifiques. *Relazioni Clinico Scientifiche*. Edizioni Ganassini. Milano, 1958.
29. — DELAUNAY A., HENON M. et PELLETIER M. — The opsonizing power of certain basic polypeptides obtained from tissues. 3th Intern. Symposium on Reticuloendothelial structure and function. Rapallo (Italy) August, 1958. Volume du Congrès, édité par J.-H. HELLER, 143.
30. — DELAUNAY A., HENON M. et PELLETIER M. — Pouvoir opsonisant non spécifique de certains polypeptides basiques. *Path. Biol.*, 1959, 7, 388.
31. — DELAUNAY A., HENON M. et PELLETIER M. — Nucléoagglutinines. I. — Nucléoagglutinines sériques. *Path. Biol.*, 1959, 7, 1883.
32. — DELAUNAY A., HENON M. et PELLETIER M. — Inhibition du métabolisme respiratoire de diverses bactéries par un polypeptide d'origine tissulaire. *Rev. Franç., Etudes Clin. et Biol.*, 1960, 2, 187.
33. — DELAUNAY A., HENON M. et PELLETIER M. — Effets antibactériens et pouvoir pro-infectieux d'une fraction polypeptidique extraite du thymus de veau. *Bull. Acad. Suisse Sc. Med.*, 1961, 17, 455.
34. — DELAUNAY A., HENON M. et PELLETIER M. — Effets antibactériens et pouvoir pro-infectieux d'un polypeptide basique extrait du thymus de veau. *II Symp. Int. s. Lisozima di FLEMING*. Milan, 7-9 avril 1961. Volume du Congrès, 51.
35. — DELAUNAY A., PELLETIER M. et HENON M. — Mise en évidence de nucléoagglutinines dans des sérums normaux ou immuns et dans différents extraits tissulaires. *C. R. Acad. Sc.*, 1957, 245, 762.
36. — DELAUNAY A., PELLETIER M. et HENON M. — Sur la nature chimique des nucléoagglutinines sériques. *C. R. Acad. Sc.*, 1957, 245, 2568.
37. — DELAUNAY A., PELLETIER M. et HENON M. — Mise en évidence d'opsonines bactériennes non spécifiques. *Ann. Inst. Pasteur*, 1958, 95, 211.
38. — DELAUNAY A., PELLETIER M. et HENON M. — Nucléoagglutinines. II. — Nucléoagglutinines tissulaires. *Path. Biol.*, 1959, 7, 1869.
39. — DESVIGNES A. — Contribution à l'étude de quelques facteurs susceptibles d'influencer la phagocytose des bactéries. *Thèse de Doctorat en Pharmacie*. Paris, 1952.
40. — DUBOS R.-J. et HIRSCH J.-G. — The antimycobacterial activity of a peptide preparation derived from calf thymus. *J. Exp. Med.*, 1954, 99, 55.
41. — ELBERG S.-S. et GALE D. — Effect of α tocopherol on the mucin enhancement of bacterial invasiveness. *J. Inf. Dis.*, 1949, 85, 304.
42. — ENGELHARD W.-E., UYENO S. et PIVNICK H. — Some modifications of *Mycobacteria* effected with trypsin. *J. Bact.*, 1957, 73, 206.
43. — FEW A.-V. et SCHULMAN J.-H. — The absorption of polymyxin E by bacteria and bacterial cell walls and its bactericidal action. *J. Gen. Microbiol.*, 1953, 9, 454.
44. — FITZGERALD R.-J. et BERNHEIM F. — The effect of sodium fluoride on the metabolism of certain *Mycobacteria*. *J. Bact.*, 1948, 55, 677.
45. — FLEMING A. — A remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions. *Proc. Roy. Soc. (London)*, 1922, 93 B, 306.
46. — FLEMING A. et ALLISON V.-D. — A bacteriolytic substance (« lysozyme ») found in secretions and tissues. *Brit. J. Exp. Path.*, 1922, 5, 252.
47. — FLEMING A. et ALLISON V.-D. — Further observations on a bacteriolytic element found in tissues and secretions. *Proc. Roy. Soc. (London)*, 1922, 94 B, 142.
48. — FOX E.-N. et STEVENSON D. — Effects of trypsin on the permeability of streptococci. *J. Bact.*, 1960, 80, 513.
49. — FROMAGEOT C. — Le lysozyme. *Suppl. au Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1948, 11-12, 63.
50. — FROMAGEOT C. et DE GARILHE P. — La composition du lysozyme en acides aminés. I. — Acides aromatiques, acides dicarboxyliques et bases hexoniques. *Bioch. Biophys. Acta*, 1949, 3, 82.
51. — GALE D. et ELBERG S.-S. — Studies on enhancement of bacterial infection by hog gastric mucin. *J. Inf. Dis.*, 1952, 91, 50.
52. — GUILLAUME J., OSTEUX R. et DERIEUX J.-C. — Sur le mode d'action des histones « arginine » sur *Escherichia coli*. *C. R. Soc. Biol.*, 1961, 155, 85.

53. — HENON M., PELLETIER M. et DELAUNAY A. — Opsonines bactériennes de nature polypeptidique. *C. R. Acad. Sc.*, 1959, **249**, 850.
54. — HENON M., PELLETIER M. et DELAUNAY A. — Substances antibactériennes d'origine tissulaire. I. — Pouvoir agglutinant de certains polypeptides basiques. *Rev. Immunol.*, 1959, **23**, 245.
55. — HENON M., PELLETIER M. et DELAUNAY A. — Substances antibactériennes d'origine tissulaire. III. — Influence de divers polypeptides sur la croissance « *in vitro* » de quelques bactéries. *Ann. Inst. Pasteur*, 1960, **98**, 710.
56. — HIRSCH J.-G. — Mechanisms involved in the anti-mycobacterial activity of certain basic peptides. *J. Exp. Med.*, 1954, **99**, 79.
57. — HIRSCH J.-G. — Bactericidal action of histone. *J. Exp. Med.*, 1958, **108**, 925.
58. — HIRSCH J.-G. — Antimicrobial factors in tissues and phagocytic cells. *Bact. Rev.*, 1960, **24**, 133.
59. — HIRSCH J.-G. et DUBOS R.-J. — Chemical studies on a basic peptide preparation derived from calf thymus. *J. Exp. Med.*, 1954, **99**, 65.
60. — HOKAMA Y., COLEMAN M.-K. et RILEY R.-F. — Phagocytosis enhancing properties of C-reactive-protein *in vitro*. *Bact. Proc.*, 1961, 134.
61. — JOLLES P. — Hydrolyse tryptique du lysozyme de blanc d'œuf de poule réduit : isolement de peptides contenant du tryptophane et de la cystine. *C. R. Acad. Sc.*, 1958, **246**, 1109.
62. — JOLLES P. et THAUREAUX J. — Hydrolyse tryptique du lysozyme d'œuf de poule. Séparation par chromatographie sur colonne et analyse des peptides de l'hydrolysate. *C. R. Acad. Sc.*, 1956, **243**, 1685.
63. — JOLLES P. et THAUREAUX J. — Structure du lysozyme d'œuf de poule. Etude des peptides de l'hydrolysate tryptique. *Biochem. Biophys. Acta.*, 1958, **27**, 298.
64. — KATCHALSKI E., BISOHOVSKI-SLOMNITZKI L. et VOLCANI B.-E. — Action of some water soluble poly α amino acids on bacteria. *Nature*, 1952, **169**, 1095.
65. — KATCHALSKI E., BISOHOVSKI-SLOMNITZKI L. et VOLCANI B.-E. — Action of some water soluble poly α amino acids on bacteria. *Biochem. J.*, 1953, **65**, 671.
66. — KAWATA T., SALL T. et MUDD S. — Spheroidal forms of *Bacillus megatherium* induced by potassium tellurite. *J. Bact.*, 1960, **79**, 459.
67. — KNAYS G. — On the nature of the granules of *Mycobacterium* and the identity of the bacterial nucleus. *J. Bact.*, 1957, **74**, 12.
68. — LALLOUETTE P. et BOURDERON G. — Essai d'une interprétation de la virulence et du pouvoir pathogène. *Rev. Immunol.*, 1961, **25**, 1.
69. — LAMBERT H.-P., SMITH H. et RICHLEY J. — The action of mucin in promoting infections; the effect of a previous injection of mucin and of α tocopherol in peanut oil. *J. Inf. Dis.*, 1953, **93**, 93.
70. — LASCHTSCHENKO P. — The effect of egg albumin in killing spores and in retarding development. *Z. f. Hyg. Infektionskr.*, 1909, **64**, 419.
71. — LEVINE H.-B., LIEN O.-G. et MAURER R.-L. — Mortality enhancing polypeptide constituents from *Pseudomonas pseudomallei*. *J. Immunol.*, 1959, **83**, 468.
72. — MELNIK M., JOURBINE V. et KOLESNIKOFF L. — Lysozyme chez les nourrissons. *Bull. Inst. Metchnikoff*. 1936, **2**, 77.
73. — MELSON A. et WEISER R. — The therapeutic action of lysozyme on pneumococcal infection of mice. *J. Inf. Dis.*, 1958, **102**, 203.
74. — MEYER E.-A. et MOSKOWITZ M. — The effect of calcium binding agents on the virulence of *Clostridium perfringens* for the white mouse. *J. Bact.*, 1955, **69**, 111.
75. — MILLER B.-F., ABRAMS R., DORFMAN A. et KLEIN M. — Antibacterial properties of protamine and histones. *Science*, 1942, **96**, 428.
76. — MORRIS M. et SEASTONE C.-V. — The relationship of M protein and resistance to phagocytosis in the beta hemolytic streptococci. *J. Bact.*, 1955, **69**, 195.
77. — MOUSTARDIER G., DULONG DE ROSNAY Ch., DU PASQUIER P. et LATRILLE J. — Influence de la protamine sur la morphologie des bactéries. *Ann. Inst. Pasteur*, 1961, **101**, 192.
78. — MOUSTARDIER G., DULONG DE ROSNAY Ch., DU PASQUIER P. et LATRILLE J. — Formes anormales induites par la protamine chez quelques *Bacillaceae*. *Ann. Inst. Pasteur*, 1962, **102**, 359.
79. — MUDD S., WINTERSCHIED L.-C., DE LAMATER E.-D. et HENDERSON H.-J. — Evidence suggesting that the granules of *Mycobacteria* are mitochondria. *J. Bact.*, 1951, **62**, 459.

80. — MYRVIK Q.-N., WEISER R.-S. et AGAR H.-D. — Lethal and cytologic effects of lysozyme on Tubercle bacilli. *Am. Rev. Tuberc.*, 1953, 67, 217.
81. — NAKAMURA O. — Lysozyme action. *Z. Immunitätsforsch.*, 1923, 38, 425.
82. — NEWTON B.-A. — Site of action of polymyxin in *Pseudomonas aeruginosa* : Antagonism by cations. *J. Gen. Microbiol.*, 1954, 10, 491.
83. — NEWTON B.-A. — A fluorescent derivative of polymyxin : its preparation and use in studying the site of action of the antibiotic. *J. Gen. Microbiol.*, 1955, 12, 226.
84. — NUNGESTER W.-F., WOLF A.-A. et JOURDONAIS L.-F. — Effect of gastric mucin on virulence of bacteria in intraperitoneal infections in the mouse. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1932, 30, 120.
85. — OLITZKI L. — Mucin as a resistance lowering substance. *Bact. Rev.*, 1948, 12, 149.
86. — PELLETIER M., HENON M. et DELAUNAY A. — Mise en évidence de nucléoagglutinines tissulaires. *C. R. Acad. Sc.*, 1958, 246, 2696.
87. — PELLETIER M., HENON M. et DELAUNAY A. — Agglutination bactérienne provoquée par des polypeptides basiques d'origine tissulaire. *C. R. Acad. Sc.*, 1959, 249, 800.
88. — PELLETIER M., HENON M. et DELAUNAY A. — Substances antibactériennes d'origine tissulaire. II. — Pouvoir opsonisant de certains polypeptides basiques. *Rev. Immunol.*, 1959, 23, 258.
89. — PELLETIER M., HENON M. et DELAUNAY A. — Substances antibactériennes d'origine tissulaire. IV. — Action d'un polypeptide extrait du thymus de veau et de corps divers sur le métabolisme respiratoire de quelques bactéries. *Path. Biol.*, 1960, 7-8, 715.
90. — PELLETIER M., HENON M. et DELAUNAY A. — Pouvoir proinfectieux d'un polypeptide extrait du thymus de veau. *Path. Biol.*, 1961, 9, 1739.
91. — REPASKE R. — Lysis of Gram negative organisms and the role of versene. *Biochem. Biophys. Acta*, 1958, 30, 225.
92. — SALTON M.-R.-J. — The properties of lysozyme and its action on microorganisms. *Bact. Rev.*, 1957, 21, 82.
93. — SALTON M.-R.-J. et HORNE R.-W. — Studies of the bacterial cell wall. I. — Electron microscopical observations on heated bacteria. *Biochem. Biophys. Acta.*, 1951, 7, 19.
94. — SANDAGE C. et STARK O.-K. — A study of the mode of action of substances which enhance bacterial invasiveness. *J. Inf. Dis.*, 1949, 84, 310.
95. — SEVAG M.-G. et MILLER R.-E. — Studies on the effect of immune reactions on metabolism of bacteria. I. — Methods and results with *Eberthella typhosa*. *J. Bact.*, 1948, 55, 381.
96. — SILVERMAN S.-J., ELWHEEL L. et KAUTER D.-A. — A mortality enhancing extract isolated from *Listeria monocytogenes*. *J. Immunol.*, 1961, 86, 668.
97. — SKARNES R.-C. et WATSON D.-W. — Characterisation of an antibacterial peptide from calf thymus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1956, 93, 267.
98. — SKARNES R.-C. et WATSON D.-W. — Antimicrobial factors of normal tissues and fluids. *Bact. Rev.*, 1957, 21, 273.
99. — SLADE M.-D. — Studies on *Streptococcus pyogenes*. III. — The effect of trypsin and a cationic detergent on the structure permeability and metabolism of the cell. *J. Gen. Physiol.*, 1957-58, 41, 63.
100. — SLOPEK S., SKURSKI A., MICHALSKA E. et DABROWSKI L. — Studies on the mechanisms of the phagocytic reaction. I. — Phagocytosis and the antigenic structure of Gram negative bacilli. *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.*, 1959, 111, 382.
101. — SMITH H. — The virulence enhancing factor of mucins. I. — A biological assay of virulence-enhancing activity. *Biochem. J.*, 1950, 46, 352.
102. — SMITH H. — The virulence-enhancing factor of mucins. II. — Fractionation studies on hog gastric mucin. *Biochem. J.*, 1950, 46, 356.
103. — SMITH H. — The virulence enhancing factor of mucins. III. — Further fractionation of hog gastric mucin ; an additional factor in the adjuvant action. *Biochem. J.*, 1951, 48, 441.
104. — SMITH H. — The virulence enhancing action of mucins. A survey of human mucins and mucosal extracts for virulence enhancing activity. *J. Inf. Dis.*, 1951, 88, 207.
105. — SMITH H. — Identification of a heparin as a mucin component of the « third factor » involved in the virulence enhancing action of hog gastric mucin. *Nature*, 1951, 168, 563.

106. — SMITH H., GALLOP R.-C., HARRIS SMITH P.-W. et STANLEY J.-L. — The virulence enhancing factor of mucins. VI. — Identification of a heparin as the main component of the third factor involved in virulence enhancement. *Biochem. J.*, 1952, 52, 23.
 107. — SMITH H., GALLOP R.-C. et STANLEY J.-L. — Virulence enhancing factor of mucins. V. — Different component of the « third factor » involved in virulence enhancement. *Biochem. J.*, 1952, 52, 15.
 108. — SMITH H., HARRIS SMITH P.-W. et STANLEY J.-L. — Virulence enhancing factor of mucins. IV. — The role of particulate insoluble matter and as various medium in virulence enhancement with a revised assay of the third factor involved. *Biochem. J.*, 1951, 50, 211.
 109. — SMITH H., ZWARTOUW H.-T., GALLOP R.-C. et HARRIS SMITH P.-W. — Virulence-enhancing factor of mucins. VII. — Remaining components of the « third factor » involved in virulence enhancement. *Biochem. J.*, 1953, 53, 673.
 110. — SMOLEIS A.-N. et HARTSELL S.-F. — The determination of lysozyme. *J. Bact.*, 1949, 58, 731.
 111. — SPITZNAGEL J.-K. — Host basic polypeptides and basic proteins in resistance to *Escherichia coli* infection. *Bact. Proc.*, 1961, 126.
 112. — SPITZNAGEL J.-K. — The effects of mammalian and other cationic polypeptides on the cytochemical character of bacterial cells. *J. Exp. Med.*, 1961, 114, 1063.
 113. — SPITZNAGEL J.-K. — Antibacterial effects associated with changes in bacterial cytology produced by cationic polypeptides. *J. Exp. Med.*, 1961, 114, 1079.
 114. — SPITZNAGEL J.-K. et HONG YUP CHI. — Cationic protein like substances associated with bacteria and leucocyte granules during phagocytosis. *Bact. Proc.*, 1963, 69.
 115. — STEMPEL H. et HUTCHINSON W.-G. — The formation and development of large bodies in *Proteus vulgaris* O x 19. I. — Bright phase contrast observations of living bacteria. *J. Bact.*, 1951, 61, 321.
 116. — STEMPEL H. et HUTCHINSON W.-G. — The formation and development of large bodies in *Proteus vulgaris* O x 19. II. — Comparative cytology of Bacilli and large bodies. *J. Bact.*, 1951, 61, 337.
 117. — SUGIMURA T. et ONO T. — On the bacteriostatic action of some basic protein fractions obtained from neoplastic tissues. *Gann.*, 1956, 48, 81.
 118. — TETI M. et FALCONE G. — Modification de la respiration de souches de *S. typhi* traitées par le lysozyme. *Riv. Ist. Sieroter. Ital.*, 1952, 27, 462.
 119. — UMBREIT W.-W., BURRIS R.-H. et STAUFFER J.-F. — Manometric technique. Un volume Burgess publishing co/Minneapolis, 1957.
 120. — VICTOR J., POLLACK A.-D., RAYMOND R. et VALLIANT J.-R. — Studies on phagocytosis determination of blood opsonin for *Brucella*. *J. Bact.*, 1952, 64, 121.
 121. — VIGOUROUX J. et HANNOUN C. — Etude des formes L des bactéries apparues spontanément *in vivo*. I. — Propriétés biologiques et pouvoir pathogène. *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, 91, 912.
 122. — VIGOUROUX J. et HANNOUN C. — Etude des formes L des bactéries apparues spontanément *in vivo*. II. — Caractères particuliers des éléments granulaires. *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, 92, 112.
 123. — WARREN G.-H. et DURSO J.-G. — Effect of lysozyme on the cell structure of *Achromobacter fischeri*. *J. Bact.*, 1952, 64, 483.
 124. — WEIBULL C. — Bacterial protoplasts. *Ann. Rev. Microbiol.*, 1958, 12, 1.
 125. — WEISSMAN W. et GRAF L.-H. — Studies on infection with *Bacillus anthracis*. VII. — A comparison on the antibacterial effect of calf thymus histone and a quaternary ammonium cationic detergent on *B. anthracis*. *J. Inf. Dis.*, 1947, 80, 145.
 126. — WOLF L.-K. — Investigation on lysozyme. *Nederland tijdschr., Geneeskunde*, 1926, 70, 2340.
 127. — WOLFF R. et BRIGNON J. — Influence et mode d'action du sulfate de protamine sur la croissance microbienne. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1954, 36, 1125.
 128. — WOOD H.-F. — Effect of C-reactive-protein on normal human leukocytes. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1951, 76, 843.
 129. — YOUNG A.-S., YOUNG G.-P. et HEGRE A.-J.-R. — Effect of homogenates of organs from immunised guinea pigs on the respiration of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bact.*, 1960, 80, 394.
-

DEUXIÈME THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

Le chimiotactisme leucocytaire. Etude in vitro.
Phénomène de chimiotactisme dans les foyers inflammatoires.

VU ET APPROUVÉ :

Paris, le 30 mars 1964.

Le Doyen de la Faculté des Sciences,
Marc ZAMANSKY.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Le Recteur de l'Académie de Paris,
Jean ROCHE.

